



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

INSTITUTO DE POSTGRADO Y EDUCACIÓN CONTINUA

“EVALUACIÓN DE DOS PROGRAMAS DE SUPEROVULACION
EN VACAS LECHERAS”

PABLO RIGOBERTO ANDINO NÁJERA

Tesis presentada ante el Instituto de Postgrado y Educación Continua de la
ESPOCH. Previa a la obtención del Grado de Magister en Producción Animal.

RIOBAMBA - 2014

DERECHOS INTELECTUALES

Yo, **Pablo Rigoberto Andino Nájera**, declaro que soy responsable de las ideas, Doctrinas y Resultados expuestos en la presente tesis de grado; y que el patrimonio intelectual generado por la misma, pertenece exclusivamente a la **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**.

PABLO RIGOBERTO ANDINO NÁJERA

0603114059

CERTIFICACIÓN:

EL TRIBUNAL DE TESIS CERTIFICA QUE:

El trabajo de investigación titulado “EVALUACIÓN DE DOS PROGRAMAS DE SUPEROVULACION EN VACAS LECHERAS” de responsabilidad de Pablo Rigoberto Andino Nájera, ha sido prolijamente revisado y se autoriza su presentación.

Tribunal de tesis:

Dr. M.C. Juan Vargas

PRESIDENTE

Dr. PhD. MSc. Francisco Caiza

TUTOR

Ing. M.C. Julio Usca

MIEMBRO

Ing. M.C. Fabián Arévalo

MIEMBRO

Riobamba, Mayo del 2014

DEDICATORIA

A MI PADRE QUE DESDE CIELO ME HA ESTADO GUIANDO,

PABLO

A MI MADRE

ELENA

A MI ESPOSA,

NANCY,

A MIS HIJOS,

PABLO, MATEO Y MARTIN.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por haberme guiado siempre por el camino del bien y permitirme recorrer los senderos del aprendizaje. Y además siempre darme la fortaleza para enfrentar obstáculos que se han presentado en mi vida y saberlos superar, y sobre todo por la felicidad que me ha brindado.

Le agradezco a mi esposa por ser siempre un pilar fundamental en mis ideales de superación. A mis padres por la enseñanza que me inculcaron de valores de honradez, humildad y superación. Por haberme dado una educación en el transcurso de mi vida.

ÍNDICE

	Pág.
Lista de Cuadros	IX
Lista de Gráficos	XI
Lista de Anexos	XII
Resumen	XIII
Abstract	XIV
I. INTRODUCCIÓN	I
II. JUSTIFICACIÓN	3
III. OBJETIVOS.....	4
A. OBJETIVO GENERAL	4
B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
IV. HIPÓTESIS.....	4
V. REVISIÓN DE LITERATURA	5
A. CONTROL ENDOCRINO DE LA REPRODUCCION	5
1. Hormonas reguladoras de la reproducción	5
2. Órganos involucrados en el sistema endocrino	8
3. Origen de los ciclos reproductivos	8
4. Ciclo estral	9
5. Fases del ciclo estral	10
B. TRACTO REPRODUCTOR DE LA VACA	13
1. Ovarios	14
2. Oviductos o Trompas de Falopio	14
3. Cuernos del útero	14
4. Cuerpo del útero	15
5. Cérvix	15
6. Vagina	15
7. Vulva	15
C. LA SUPEROVULACIÓN	16
1. Definición e importancia	16
2. Factores que intervienen en la respuesta a la ovulación múltiple	16
3. Selección de las hembras donantes	21
4. Tratamientos hormonales para la superovulación	29
5. Gonadotrofinas utilizadas para inducir superovulación	33
6. Fecundación de la hembra donante	35
	VI

a. Inseminación artificial de la donante	35
D. COLECTA DE EMBRIONES	36
1. Importancia	36
2. Materiales necesarios para la colecta de embriones	37
3. Colecta de embriones no quirúrgica	39
4. Búsqueda de embriones	41
5. Identificación de los embriones	42
6. Estadios de desarrollo del embrión	42
7. Clasificación de los embriones	44
E. MEDIOS PARA EL MANEJO Y MANTENIMIENTO DE EMBRIONES	44
1. Composición de los medios	45
F. CONSERVACIÓN DE EMBRIONES	47
1. Conservación por enfriamiento a 5 °C	48
2. Conservación por congelamiento en nitrógeno líquido	48
3. Técnica de congelamiento	49
4. Técnica de descongelamiento	50
5. Técnica de vitrificación	51
6. Consideraciones en la clasificación de embriones descongelados	51
G. RECEPTORAS QUE PUEDEN SER ÚTILES PARA RECIBIR UN EMBRIÓN	52
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
A. LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO	53
B. UNIDADES EXPERIMENTALES	53
C. MATERIALES Y EQUIPOS	54
1. Instalaciones	54
2. Animales	54
3. Hormonas y fármacos	54
4. Materiales de inseminación artificial	55
5. Materiales y equipos para el lavado de embriones	55
6. Materiales y equipos para la búsqueda y congelación de los embriones	55
7. Materiales de limpieza y desinfección	56
8. Otros materiales	56
D. TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL	57
E. MEDICIONES EXPERIMENTALES	57

F. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	57
G. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	58
1. De campo	58
2. Programa sanitario	61
H. METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN	61
1. Edad de las vacas, años	61
2. Pesos, kg	62
3. Condición corporal, puntos	62
4. Embriones recolectados por animal, N°	62
5. Cantidad de embriones viables, %	62
6. Costo por embrión viable para conservación, dólares	63
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
A. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANIMALES	63
1. De acuerdo a la raza	64
2. De acuerdo a la edad	65
3. De acuerdo al peso	66
4. Condición corporal	67
B. EFECTO DE LOS PROTOCOLOS DE LA SUPEROVULACION	68
1. De acuerdo a los tratamientos	68
2. De acuerdo a la raza	70
C. ESTRUCTURAS Y EMBRIONES COLECTADOS	71
1. Total de estructuras colectadas	72
2. En base al desarrollo embrionario	74
D. EMBRIONES VIABLES Y NO VIABLES	78
1. De acuerdo a los tratamientos	78
2. De acuerdo a la raza	81
E. PORCENTAJE DE EMBRIONES VIABLES Y NO VIABLES	81
F. EVALUACIÓN ECONÓMICA	85
VIII. CONCLUSIONES	87
IX. RECOMENDACIONES	89
X. BIBLIOGRAFIA.....	95

LISTA DE CUADROS

Nº		Pág.
1.	CARACTERÍSTICAS INTERNAS Y EXTERNAS DEL CICLO ESTRAL BOVINO.	13
2.	CALENDARIO DE VACUNACIÓN AL AÑO.	25
3.	ESQUEMA TRADICIONAL DE SUPEROVULACIÓN EN BOVINOS.	30
4.	TRATAMIENTO SUPEROVULATORIO CON FSH.	31
5.	TRATAMIENTO SUPEROVULATORIO CON PMSG.	33
6.	MOMENTO DE RECOLECCIÓN NO QUIRÚRGICA DE EMBRIONES.	37
7.	SOLUCIÓN BUFFER – FOSFATO – SALINA (FORMULA PARA PREPARAR 10 LITROS).	45
8.	CONDICIONES METEOROLÓGICAS DE LA ZONA DE INFLUENCIA DEL ESTUDIO.	53
9.	ESQUEMA DEL EXPERIMENTO.	57
10.	PROTOCOLOS UTILIZADOS PARA LA SUPEROVULACION.	59
11.	CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN PARA EMBRIONES BOVINOS.	63
12.	CARACTERÍSTICAS DE LAS VACAS LECHERAS A SER SOMETIDAS A DOS PROGRAMAS DE SUPEROVULACIÓN PARA LA OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE EMBRIONES.	64
13.	EFFECTO DE DOS PROGRAMAS DE SUPEROVULACIÓN EN VACAS LECHERAS DE DIFERENTES RAZAS.	69
14.	RESPUESTAS DE SUPEROVULACIÓN EN VACAS LECHERAS DE DIFERENTES RAZAS CON DIFERENTES TRATAMIENTOS HORMONALES.	71
15.	ESTRUCTURAS Y EMBRIONES RECOLECTADOS DE VACAS DE DIFERENTES RAZAS POR EFECTO DE DOS PROGRAMAS DE SUPEROVULACIÓN.	72
16.	EMBRIONES VIABLES Y NO VIABLES COLECTADOS DE VACAS DE DIFERENTES RAZAS POR EFECTO DE DOS PROGRAMAS DE SUPEROVULACIÓN.	79
17.	PORCENTAJE DE EMBRIONES VIABLES Y NO VIABLES COLECTADOS DE VACAS DE DIFERENTES RAZAS POR	

	EFFECTO DE DOS PROGRAMAS DE SUPEROVULACIÓN.	83
18	ANÁLISIS ECONÓMICO (DÓLARES) DEL COSTO POR EMBRIÓN VIABLE COLECTADO DE VACAS LECHERAS DE DIFERENTES RAZAS POR EFECTO DE DOS PROGRAMAS DE SUPEROVULACIÓN.	86

LISTA DE GRÁFICOS

Nº		Pág.
1.	Distribución de las vacas que fueron sometidas a dos programas de superovulación, de acuerdo al grupo genético.	65
2.	Edad de las vacas que fueron sometidas a dos programas de superovulación, de acuerdo al grupo genético.	66
3.	Peso de las vacas que fueron sometidas a dos programas de superovulación, de acuerdo al grupo genético.	67
4.	Condición corporal de las vacas que fueron sometidas a dos programas de superovulación, de acuerdo al grupo genético.	68
5.	Efecto de dos programas de superovulación, en vacas lecheras de diferentes razas.	69
6.	Efecto de dos programas de superovulación, en vacas lecheras según el grupo genético.	71
7.	Cantidad de estructuras colectadas por efecto de dos programas de superovulación, en vacas lecheras de diferentes razas.	73
8.	Cantidad de embriones viables y no viables obtenidos por efecto de dos programas de superovulación, en vacas lecheras de diferentes razas.	77
9.	Cantidad de embriones viables y no viables obtenidos según el grupo genético de las vacas lecheras sometidas a dos programas de superovulación.	81
10.	Porcentaje de embriones viables y no viables obtenidos por efecto de dos programas de superovulación, en vacas lecheras.	83
11.	Porcentaje de embriones viables y no viables obtenidos de acuerdo al grupo genético de vacas lecheras sometidas a dos programas de superovulación.	85

LISTA DE ANEXOS

Nº

1. Registro de los resultados de campo de las vacas que fueron sometidas a dos programas de superovulación.
2. Clasificación de las vacas lecheras que fueron sometidas a dos programas de superovulación, según el grupo genético
3. Análisis estadísticos según la prueba de Ji cuadrado del porcentaje de vacas lecheras que respondieron a los programas de superovulación.
4. Análisis estadísticos de las estructuras y embriones obtenidos de vacas lecheras por efecto de dos programas de superovulación.
5. Análisis estadísticos de los embriones viables y no viables obtenidos de vacas lecheras por efecto de dos programas de superovulación.
6. Análisis estadísticos según la prueba de Ji cuadrado del porcentaje de embriones viables obtenidos de vacas lecheras sometidas a dos programas de superovulación

RESUMEN

Investigación para la evaluación de dos programas de superovulación en vacas lecheras. Fue realizada en diferentes explotaciones lecheras de la Sierra Centro del Ecuador.

Se evaluó el efecto de la superovulación en vacas lecheras de diferentes razas en base a implantes de dispositivos intravaginales de P4 (DIB) + EB más la aplicación o no de GnRH durante la 1ª Inseminación artificial, utilizándose 24 vacas lecheras (54.17 % Brown swiss, 25.00 % Holstein Friesian y 20.83 % Jersey), siendo cada una de ellas una unidad experimental y distribuidas bajo un DCA.

Los resultados experimentales se sometieron a un análisis estadístico descriptivo con las pruebas de Chi cuadrado (X^2) y de t'studen para comparar el efecto de los tratamientos. Determinándose que los programas de superovulación utilizados presentaron respuestas similares estadísticamente, sin embargo las vacas que recibieron la GnRH numéricamente mostraron un mayor número de animales que superovularon (91.67 % frente al 83.33 %), mayor cantidad de estructuras totales colectadas (10.73 ± 7.00 frente a 8.40 ± 4.14 por vaca) y embriones viables (9.36 ± 6.09 vs 7.10 ± 3.54 por vaca), que corresponden al 87.30 % y 84.50 % respectivamente. La raza tuvo una influencia directa en los parámetros evaluados

Se concluye que con la aplicación de GnRH después de la 1ª IA, cada embrión viable tiene un costo de 54.47 dólares, mientras que sin la GnRH, es de 71.58 dólares.

Por lo que se recomienda a los ganaderos que deseen tener animales de alto valor genético en cuanto a la producción de leche provocar la superovulación con implantes intravaginales de P4 (DIB) + EB más la aplicación de GnRH durante la primera Inseminación artificial, para mejorar la cantidad y calidad de los embriones a colectar.

ABSTRACT

This research was carried out to evaluate two programs of multiple ovulation in milk cows. It was made in different milk farms in the Sierra Centro of Ecuador.

It was evaluated the effect of the multiple ovulation in milk cows of different breed based on intravaginal devices implants of Progesterone (P4) Bobine Intravaginal Device (BID) + Estradiol Benzoate (EB) and the application or not of Gonadotropin- releasing hormone (GnRH) during the 1st Artificial Insemination (AI), in 24 milk cows of breed (54.17 % Brown Swiss, 25.00 % 20.83 % Holstein Friesian and Jersey), being each one of them an experimental unit and distributed under a Completely Randomized Design (CRD).

The experimental results were subjected to an descriptive statistical analysis with Chi- squared (χ^2) and t'studen tests, to compare the effect of treatments. Determining that the multiple ovulation programs used showed statistically similar data. However, cows which receiving GnRH showed numerically greater number of over ovulated animals (91.67 % vs. 83.33 %), higher total amount of collected structures (10.73 + 7.00 vs. 8.40 + 4.14 per cow) and viable embryos (9.36 + 6.09 vs 7.10 + 3.54 per cow), corresponding to 87.30 % and 84.50 % respectively. The cows breed had a direct influence on the parameters evaluated.

It is concluded that the application of GnRH after the 1st IA, each viable embryo cost \$ 54.47, while without GnRH, was \$ 71.58.

Livestock farmers who wish to have animals with high genetic value in terms of milk production it is recommended to cause multiple ovulation in milk cows with intravaginal implants of P4 (BID) + EB and the GnRH application in the first artificial insemination to improve quantity and quality of embryos production.

I. INTRODUCCIÓN

La obtención de animales de alta calidad genética para incrementar la producción de leche y carne en el Ecuador, generalmente se hace importando animales de otros países a costos muy elevados. En la última década, la reproducción en ganado bovino ha evolucionado de manera acelerada, marcando el inicio de una nueva etapa. Esta se caracteriza por el desarrollo de una serie de técnicas que contribuyen a aumentar, en forma rápida la capacidad reproductiva y de mejoramiento genético.

González, R. (2012), manifiesta que las técnicas para la manipulación del proceso reproductivo que han recibido mayor atención y desarrollo en los últimos años han sido la ovulación múltiple y transferencia embrionaria, congelación de embriones, producción de gemelos, producción de embriones in vitro, multiplicación de embriones, bisección o transferencia nuclear, sexado de embriones, sexado de fetos, transferencia de genes.

El ganado bovino tradicionalmente ha sido mejorado genéticamente desde el lado paterno mediante el uso de la Inseminación Artificial (IA). Pero, mediante la técnica de la Transferencia de Embriones (TE), se puede acelerar el mejoramiento del ganado desde el lado materno, disminuyendo el intervalo entre generaciones y acelerando el proceso de selección, obteniendo un gran número de progenie de donadoras valiosas que permitirá incrementar la producción animal (Unión Ganadera Regional de Jalisco, 2012).

Por consiguiente, la transferencia de embriones es la técnica mediante la cual, los embriones (óvulos fertilizados), son colectados del cuerno uterino de la hembra donadora antes de la nidación, y transferidos al cuerno uterino de otras hembras receptoras para completar su gestación.

La superovulación (SPO), es la inducción de ovulaciones múltiples mediante el uso de productos hormonales. Esta técnica es empleada en el procedimiento de producción y colecta de embriones. El objetivo principal del tratamiento de superovulación en el ganado bovino es producir el mayor número de

ovulaciones, mediante lo cual llevar acabo también inseminaciones artificiales para obtener el máximo número de embriones transferibles que resulten en una alta probabilidad de preñez.

Bolívar, P. y Maldonado, J. (2008), señalan que la superovulación y la sincronización, no pueden verse como un hecho aislado, sino que éstas se basan en una serie de acontecimientos fisiológicos que abarcan procesos endocrinos desde el ciclo estral hasta la ovulación de los folículos que se han desarrollado en respuesta al tratamiento hormonal suministrado y que son los responsables en gran medida de que la respuesta al tratamiento sea de alta calidad, en términos de embriones recuperados y de su calidad.

Por lo que en el presente trabajo se estudió el efecto de la inducción de la superovulación con la aplicación de dispositivos intravaginales de progesterona (DIB®) más la aplicación de Benzoato de estradiol y la aplicación de FSH (Foltropin®) con la variación de que al momento de la primera IA, un grupo recibió la aplicación de GnRH y otro grupo no, para posteriormente determinar su efecto con relación al número de embriones recolectados, su calidad y cantidad de embriones viables y proceder a su conservación y almacenamiento por corto plazo.

II. JUSTIFICACIÓN

Los tratamientos hormonales para lograr una ovulación múltiple y la Transferencia de Embriones (TE), permiten utilizar intensivamente a las hembras genéticamente superiores. En los últimos 25 años se han logrado considerables avances en la TE, como herramienta del mejoramiento genético, siendo necesario maximizar la producción y sobrevivencia de embriones para obtener varias crías de alto mérito genético. Cabe señalar que una hembra de alto valor genético podrá formar parte de un programa de transferencia en más de una oportunidad, de manera que es posible multiplicar su potencial reproductivo, al utilizarse vacas de escaso valor genético como receptoras de embriones genéticamente superiores (Gibbons, A. y Cueto, M. 2010).

La estimulación hormonal de los ovarios desencadena la ovulación múltiple y permite multiplicar la tasa ovulatoria promedio de una raza, obteniéndose un número considerable de crías en un corto período de tiempo.

Por consiguiente el presente trabajo tiene gran importancia por cuanto la producción de embriones por superovulación de la donadora, a través de la estimulación hormonal de los ovarios, seguido de la IA y posterior lavado uterino para la obtención de los embriones que son colectados y transferidos a hembras receptoras, es una forma eficiente de multiplicación de los mejores individuos de un hato, pudiéndose obtener en un año embriones de excelente calidad lo que tal vez en toda la vida del animal se podría obtener, con lo que se está acortando el tiempo de mejorar genéticamente nuestra ganadería por consiguiente incrementar nuestra producción.

Con la utilización de estas biotecnologías en la reproducción se está avanzando en el tiempo y con esto asegurando una alimentación adecuada para la humanidad, de lo que hoy en día se habla mucho de la seguridad alimentaria.

Además, los trabajos de transferencia de embriones bovino en nuestro país, han sido de forma aislada o no se han reportado resultados y sobre todo en

relación a su costo beneficio.

III. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Evaluar dos programas de superovulación y su efecto en la calidad y cantidad de embriones recuperados.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto de la sincronización de la ovulación en vacas lecheras con la utilización de dispositivos intravaginales de P4 + EB y de FSH y más la aplicación o no de GnRH durante la 1ª Inseminación artificial, para mejorar la viabilidad de los embriones.
- Comparar la calidad de los embriones que se obtengan de vacas lecheras sometidas a los procesos de superovulación con la aplicación o no de GnRH durante la 1ª Inseminación artificial.
- Determinar el costo por embrión viable obtenido en cada tratamiento experimental.

IV. HIPÓTESIS

Ho: El empleo de dos protocolos hormonales dispositivos intravaginales de P4 (DIB®) + EB, para la superovulación en base a FSH (Folltropin ®) en vacas lecheras y la no aplicación de GnRH (Gonaxal®) durante la 1ª Inseminación artificial en las vacas donadoras, NO permitirá obtener una mayor cantidad de embriones viables.

H1: El empleo de dos protocolos hormonales dispositivos intravaginales de P4 (DIB®)+ EB, para la superovulación en base a FSH (Folltropin ®) en vacas lecheras y más la aplicación de GnRH (Gonaxal®) durante la 1ª Inseminación

artificial en las vacas donadoras, permitirá obtener una mayor cantidad de embriones viables.

V. REVISIÓN DE LITERATURA

A. CONTROL ENDOCRINO DE LA REPRODUCCIÓN

1. Hormonas reguladoras de la reproducción

a. Progesterona (P4)

Esta hormona es producida en el ovario por el cuerpo lúteo, también por la placenta y la glándula suprarrenal. Después que ocurre la ovulación del folículo dominante, se forma el cuerpo lúteo. Si el huevo liberado fue fecundado, la progesterona prepara el endometrio para la implantación del embrión, esta produce un efecto al incrementar el número de glándulas secretorias endometriales, lo cual inhiben la motilidad del miometrio para que el embrión sea reconocido, este proceso se le conoce como reconocimiento de preñez. El cuerpo lúteo se mantiene produciendo progesterona. Por eso se dice que es la hormona encargada de mantener la preñez (Orellana, J. y Peralta, E. 2007).

Según Gibbons, A. y Cueto, M. (2010), la progesterona es un esteroide secretado por el cuerpo lúteo; en el caso de ocurrir fertilización, se mantiene en valores constantes durante la gestación a partir de la placenta y del cuerpo lúteo. Su función es mantener la preñez hasta la parición. Antes de la ovulación, participa con los estrógenos en la manifestación externa del celo. Ejerce un retrocontrol negativo sobre el hipotálamo, inhibiendo la secreción de GnRH y la consiguiente pulsatilidad de LH, de manera que bloquea la ovulación.

b. Estrógenos (E2)

Se clasifican en Estrógenos como el estradiol y la estrona, así como en Estrógenos exógenos, como el dietilestilbestrol. Su lugar de síntesis en el organismo son los ovarios inactivos, su función es la de producir la dilatación

del cerviz, ya sea durante el parto o en el día 7 posparto en casos de retención placentaria. Se emplea también en el tratamiento de piómetra, retenciones placentarias y metritis (<http://zootecniaymas.blogspot.com>. 2007).

Según Fosado, M. (2007), las altas concentraciones de E2 inducen que:

- El cuerpo del útero esté turgente y produzca líquido uterino.
- La cerviz produzca moco y se abra para permitir la entrada del semen.
- La vagina se prepare para recibir el semen y esté bien lubricada.
- La vulva presente edema e hiperemia.
- La vaca muestre comportamiento homosexual.
- La vaca esté receptiva a la monta.

c. Prostaglandina F2 α (PGF2 α)

La Prostaglandina F2 α , es la encargada de romper el cuerpo lúteo, una vez que el huevo no se fertilizó o ha llegado el momento del parto. Es considerada una parahormona porque actúa localmente en el lugar donde se produce, no se encuentra en ningún tejido específico y son degradadas con rapidez en la sangre, debido a esto no se apegan a la definición clásica de hormona. Esta parahormona lisa el cuerpo lúteo, caen los niveles altos de progesterona y así los folículos comienzan nuevamente a crecer y desarrollarse (ondas foliculares) por el efecto de la FSH. Es decir, la vaca comienza un nuevo ciclo estral (Orellana, J. y Peralta, E. 2007).

La PGF2 α , se encuentra comercialmente con el nombre de Dinoprost, o también sus análogos, como el Tiaprost, Cloprostenol, Fluprostenol, etc. Su principal indicación es para la sincronización de los calores en hembras que presenten su cuerpo lúteo. Tratamiento de catarros genitales, piometras, expulsión de fetos momificados y mecerados, eliminación de cuerpos lúteos patológicos e inducción del parto hasta unos 15 días antes de la fecha estimada del mismo (<http://zootecniaymas.blogspot.com>. 2007).

d. Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH)

La GnRH u hormona liberadora de las gonadotropinas es un decapeptido producido por neuronas secretoras del sistema nervioso central. La secreción de esta hormona está influenciada por condiciones externas como el fotoperíodo, stress, nutrición; e internas como los estrógenos, progesterona y feromonas (<http://zootecniaymas.blogspot.com>. 2007).

Es un neurotransmisor. Cuando el hipotálamo libera GnRH, ésta es receptada por la hipófisis o pituitaria anterior para que produzca la liberación de FSH y LH al torrente sanguíneo. La GnRH tiene un efecto directo sobre la oleada preovulatoria que se inicia por los altos niveles de estrógenos procedentes del folículo que se está madurando (Gibbons, A. y Cueto, M. 2010).

e. Hormona Folículo Estimulante (FSH)

Ésta es secretada por la hipófisis anterior. Viaja a través del torrente sanguíneo hasta llegar a los ovarios, donde desempeña su función estimulando el crecimiento y maduración de los folículos. La FSH se utiliza principalmente en el desarrollo folicular para inducir ovulaciones múltiples con fines de realizar la transferencia de embriones (Orellana, J. y Peralta, E. 2007).

Gibbons, A. y Cueto, M. (2010), señalan que la FSH favorece el crecimiento y la maduración folicular y de los ovocitos; induce en los folículos maduros la presentación de receptores a la LH y sostiene la liberación de estrógenos. La secreción basal está asociada a la dinámica folicular durante la fase luteal y presenta dos incrementos durante la fase folicular: el primero conjuntamente a la descarga preovulatoria de LH, que es GnRH dependiente y otro, de menor intensidad, 18 horas más tarde producto de la caída de los niveles sanguíneos de los estrógenos (no dependiente de la GnRH).

f. Hormona Luteinizante (LH)

La LH es producida por la hipófisis anterior, desempeña su función en el ovario

ayudando en las últimas etapas de maduración y luteinización del folículo. Las altas concentraciones de estrógenos en el torrente sanguíneo tienen un efecto positivo sobre el hipotálamo, lo cual induce la oleada preovulatoria de la LH que causa la rotura de la pared folicular y la ovulación. Este es el único momento que se encuentra en altas concentraciones (Orellana, J. y Peralta, E. 2007). Gibbons, A. y Cueto, M. (2010), reportan que la LH incrementa su concentración durante un corto período previo a la ovulación en forma de pulsos. La frecuencia de los pulsos de LH está supeditada a la estimulación de las células hipofisarias por la GnRH. Cada pulso de LH se corresponde con un pulso de GnRH. Durante la fase preovulatoria, el incremento de la secreción de estrógenos liberados por los folículos ejerce un retrocontrol positivo sobre el eje hipotálamo hipofisario, que induce al denominado “pico preovulatorio de LH”. Además, la LH participa conjuntamente con la FSH en la maduración final del folículo, induce la liberación del ovocito (ovulación) y la formación del cuerpo lúteo a partir del folículo que presentó ovulación.

2. Órganos involucrados en el sistema endocrino

Según Díaz, N. (2007), los órganos involucrados en el sistema endocrino son:

- Cerebro: La parte del cerebro involucrada es el hipotálamo, el cual produce GnRH.
- Hipófisis o pituitaria anterior: Acepta el estímulo de GnRH para producir FSH y LH.
- Tejido sanguíneo: Se encarga en llevar el FSH y LH a los ovarios y además, los E2 y P4.
- Ovario: Lugar de acción del FSH y LH.

3. Origen de los ciclos reproductivos

<http://zootecniaymas.blogspot.com>. (2007), indica que la reproducción en las hembras constituye un proceso cíclico que es inducido por la interacción del hipotálamo, hipófisis y los ovarios. El hipotálamo es el centro donde se integra y procesa la información procedente tanto del propio sistema nervioso central,

como del exterior y del ovario. El resultado de esta regulación es la regulación de secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). La GnRH es secretada de forma pulsátil con una frecuencia de 70 a 90 minutos, esta liberación induce a la que las gonadotropinas sean también secretadas en pulsos. Sin embargo, los pulsos secretores de gonadotropinas varían durante el ciclo estral aumentando en la fase folicular y disminuyendo en la fase lútea del ciclo. Estas variaciones demuestran el efecto estimulador e inhibidor que ejercen las hormonas ováricas sobre el eje hipotálamo-hipófisis originando como consecuencia los ciclos reproductores. Al comienzo de la fase folicular, los folículos inmaduros secretan pequeñas cantidades de estrógenos que inducen un efecto de retroalimentación negativa en el hipotálamo e hipófisis, provocando la secreción tónica de la Hormona Folículo Estimulante (FSH) y la Hormona Luteinizante (LH).

Cuando uno de los folículos alcanza la fase de folículo dominante, el aumento sostenido de los niveles circulantes de estrógenos estimula el centro cíclico produciendo la secreción del pico de LH. Este pico desencadena la maduración final, ovulación y luteinización folicular. Además, el folículo dominante secreta grandes cantidades de inhibina, que actúa en la hipófisis inhibiendo la secreción de FSH, sin alterar la secreción de LH, produciéndose la atresia de los restantes folículos. La ovulación determina el final de la fase folicular y el comienzo de la fase lútea del ciclo. La elevada concentración de progesterona, producida por el cuerpo lúteo, junto con la baja concentración de estrógenos, origina nuevamente la retroalimentación negativa de forma que las gonadotropinas retroceden a los niveles basales. La luteolisis se produce por la secreción de PGF2 α del endometrio no gestante, provocando la disminución en los niveles sanguíneos de progesterona al mismo tiempo que se inicia un nuevo ciclo.

4. Ciclo estral

Díaz, N. (2007), define como el periodo de tiempo comprendido desde la aparición de un estro hasta el comienzo del siguiente, designándose el primer día del ciclo (día 0) aquel que coincide con la aparición del estro. La duración

de un ciclo estral constituye un periodo de tiempo característico para cada especie animal. La ovulación al igual que en los primates, es un proceso espontáneo, pero que a diferencia de estos, en los animales domésticos es predecible, ya que el estro conductual generalmente coincide con la descarga preovulatoria del pico de LH. La hembra acepta al macho para que el apareamiento exclusivamente durante el periodo del estro. El origen del comportamiento de receptividad sexual durante el estro está directamente relacionado con las variaciones en la concentración sanguínea de las hormonas esteroides. En algunas especies un incremento en la concentración de 17β estradiol en la sangre es capaz de desencadenar la receptividad sexual.

5. Fases del ciclo estral

a. Proestro

Este período, cuya duración es de 3 días, comienza con la regresión del cuerpo lúteo del ciclo anterior y finaliza con la manifestación de celo. Al producirse la destrucción del cuerpo lúteo se tiene una caída en los niveles de progesterona y posteriormente una pérdida de tejido luteal, siendo la $\text{PGF2}\alpha$ de origen uterino el principal luteolítico en los animales domésticos y en la mayoría de los roedores.

Como consecuencia de la caída de los niveles de progesterona, disminuye el feed back negativo que dicha hormona tenía a nivel hipotalámico y comienzan a aumentar la frecuencia pulsátil de las hormonas gonadotróficas (FSH y LH) y se estimula el crecimiento folicular con el desarrollo de un gran folículo y el aumento en los niveles de estradiol. Cuando los estrógenos alcanzan cierto nivel, se estimula la receptividad al macho y comienza el período de celo o estro (<http://www.produccion-animal.com.ar>. 2010).

b. Estro

El celo o estro es la etapa más fácilmente reconocible del ciclo estral, porque es caracterizada por una serie de cambios visibles en el comportamiento que

incluyen la receptividad sexual y la copulación. El estradiol es la hormona dominante durante esta etapa del ciclo y no solo induce estos cambios del comportamiento, sino que también provoca cambios fisiológicos en el tracto reproductivo. Cuando la hembra entra en celo lo hace gradualmente y no es totalmente receptiva al principio, puede demostrar algunas características de su aproximación a la etapa receptiva las cuales incluyen incremento en la locomoción, en la vocalización, nerviosismo e intentos de montar a otros animales. Sin embargo en esta etapa no es todavía receptiva. A medida que el celo progresa también incrementa el grado de aceptación del macho y se puede realizar la cópula. Esta voluntad de la hembra de recibir al macho (u otras hembras), se denomina reflejo de parada o quietud. Es en este momento que la hembra adopta una postura característica arqueando el dorso (lordosis) y este reflejo puede incluso ser utilizado por el hombre para detectar el celo y de esta manera planificar el servicio o IA (Aguilar, J. 2001).

Durante el estro, cuya duración es de 18 ± 6 horas, la vaca manifiesta inquietud, ansiedad, brama con frecuencia y pierde el apetito; en el caso de las vacas lecheras, se reduce su producción. Las vacas presentan descarga de mucus con mínima viscosidad (filante), cuyo olor atrae y excita al toro (presencia de feromonas), edema de vulva y en el útero se produce un aumento del tono miometrial, detectado fácilmente por palpación transrectal. Durante esta fase, los estrógenos en altas concentraciones alcanzan el umbral de estimulación del centro cíclico hipotalámico, estimulando a las neuronas hipotalámicas a producir el pico de GnRH y en consecuencia el pico de LH. Con respecto a la FSH, disminuye su secreción, consecuencia del feed back negativo estrogénico y de la inhibina, con excepción del momento en que se produce el pico preovulatorio de LH, en que puede aparecer un pico de FSH. Posteriormente, 4 a 12 horas después de la onda de LH, se incrementan la concentración basal y la amplitud de los pulsos de FSH, relacionándose esto con la primera onda de crecimiento folicular (<http://www.produccion-animal.com.ar>. 2010).

c. Metaestro

El período inmediato a la finalización del celo, es el metaestro (6 días). En este

período ocurre la ovulación de la vaca, a diferencia de las otras especies que lo hacen durante el celo, y comienza la organización celular y desarrollo del cuerpo lúteo. La ovulación ocurre 28 a 32 horas de iniciado el celo y es desencadenada por el pico preovulatorio de LH. A la ovulación sigue hemorragia profunda y el folículo se llena de sangre convirtiéndose en cuerpo hemorrágico. En la formación del cuerpo lúteo (luteinización), se producen una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que permiten que las células foliculares se transformen en células luteales, cambios que finalizan al séptimo día con un cuerpo lúteo funcional (<http://www.produccion-animal.com.ar>. 2010).

Las células de la granulosa se hipertrofian junto con la amplia red de capilares que forman el cuerpo lúteo secretor de Progesterona. La producción de Estradiol disminuye. En esta etapa algunas vacas presentan sangrado metaestral (González, R. 2012).

d. Diestro

González, R. (2012), señala que al 5to día hay un cuerpo lúteo maduro. Las concentraciones en sangre de Progesterona son mayores a 1 ng/ml. El Diestro continúa hasta el día 14. La Progesterona es responsable de la formación del Endometrio para el establecimiento y mantenimiento de la gestación. Estimula la secreción de sustancias que nutren al embrión hasta que existe la placenta; inhibe las contracciones del útero, el moco cervical se torna más viscoso y cierra la cerviz evitando la entrada de agentes extraños al útero. También estimula en la glándula mamaria la síntesis alveolar y la secreción láctea.

Después de 12 días de acción de la Progesterona, en el útero se agotan sus receptores y se vuelve refractario a esta hormona. El Estradiol folicular estimula en el útero la formación de receptores para la Oxitocina y la producción de enzimas Fosfatasa A y Ciclooxygenasa, indispensables para la síntesis de Prostaglandina F2 α . De esta forma la Oxitocina producida por el cuerpo lúteo estimulara la secreción de Prostaglandina F2 α en las glándulas endometriales en forma pulsátil cada 6 a 8 horas. Esto provoca la regresión del cuerpo lúteo y los niveles de Progesterona bajan a menos de 1 ng/ml terminando el diestro y

comenzando el proestro.

El cuerpo lúteo secreta Progesterona en cantidades máximas desde el día 7 hasta el día 15. Cuando la secreción de Progesterona declina bruscamente (día 17), desencadena la secuencia de cambios hormonales que producen el Estro y la ovulación. Por lo tanto, la función del cuerpo lúteo es el reloj biológico que controla la duración del ciclo estral.

En resumen, Agro Capacitación Argentina (AGROCOR. 2005), señala que el ciclo estral del bovino está caracterizado por eventos fisiológicos y endocrinológico que se resumen en el (Cuadro 1).

Cuadro 1. CARACTERÍSTICAS INTERNAS Y EXTERNAS DEL CICLO ESTRAL BOVINO.

Día del ciclo estral	Hallazgos clínicos		
	Palpación rectal	Útero	Signos externos
16 – 18	CL 20 a 25 mm. Folículo 8 a 10 mm	Discreto aumento del tono, al final.	Ausencia de signos de estro.
19 – 20	CL 10 a 15 mm. Folículo 12 a 15 mm	Presencia de tono.	Pro estro: vulva poco turgente, vestíbulo ligeramente congestionado.
0	CL menos de 10 mm. Folículos 20-22 mm. Suaves y lisos. Después ovulación. Área suave y cráter en el ovario.	Marcada tonicidad.	Estro: Turgencia vulvar, vestíbulo hiperémico, descargas copiosas de moco cristalino.
1 – 4	CL que alcanza 15 mm al 4to. Día.	Edema	Meta estro: 1er. día después del estro, leve descarga mucosa, puede presentarse el sangrado metaestral.
4 – 15	CL del 8º Día 18-20 mm. CL del 10º Día 20-30 mm	Fisiológicamente flácido.	Discreta congestión de la mucosa vestibular al inicio de este período.

Fuente: AGROCOR. (2005).

B. TRACTO REPRODUCTOR DE LA VACA

Antes de hablar sobre la superovulación en bovinos para la colecta y conservación de embriones necesarias para la Transferencia de Embriones

(T.E), se debe conocer todas las partes del tracto reproductor para identificar las situaciones que presenta la hembra desde que está en celo hasta cuando pueda presentar un problema dentro del tracto reproductivo, es el primer paso para inseminar, colectar y transferir embriones (ABS. 2006).

A continuación se presenta una descripción breve de las partes del tracto reproductivo de craneal a caudal.

1. Ovarios

Según Hincapié, J. (2004), en el bovino son de forma ovalada y miden 3.5 a 4 cm de longitud, 2.5 cm de ancho y 1.5 cm de espesor y su peso varía entre los 15-20 gramos. El tamaño está influenciado por el cuerpo lúteo.

En los ovarios se encuentran los folículos inmaduros, en crecimiento y maduros; dentro de los folículos se encuentran el huevo u oocito que es expulsado al momento de la ovulación. Durante un ciclo normal de la vaca solo un folículo llega a madurar y ovular, raras veces dos (ABS. 2006).

2. Oviductos o Trompas de Falopio

El oviducto sostiene el ovario por medio de las fimbrias, quienes se encargan de capturar el oocito al momento de la ovulación; el oocito avanza sobre el oviducto para encontrarse con los espermatozoides y poder ser fecundado o fertilizado. El oviducto está dividido en istmo y ámpula, el punto donde se lleva a cabo la fecundación o fertilización del huevo se llama unión istmo-ampular (ABS. 2006).

3. Cuernos del útero

El oviducto termina donde inicia el cuerno uterino, 9 días después, el huevo fecundado ya es un embrión maduro y ha atravesado todo el oviducto y puede estar localizado en el cuerno derecho o en el izquierdo dependiendo en donde se produjo la ovulación. En el cuerno del útero se hace el reconocimiento del

embrión, las paredes del cuerno reconocen el embrión y éste es adherido a ella para dar origen al nuevo feto (ABS. 2006).

4. Cuerpo del útero

Según Fosado, M. (2007), éste es el lugar donde el feto va a crecer y a desarrollarse. El útero durante el celo está turgente y lleno de líquido uterino, el cual es el medio donde los espermatozoides pueden desplazarse hacia los cuernos y luego hacia el oviducto. Además el útero está haciendo contracciones para evacuar espermatozoides muertos o cualquier patógeno que haya atravesado la cervix, ya que al momento del celo éste se abre para permitir la entrada del esperma.

5. Cervix

También conocido como cuello del útero. Éste varía en grosor y longitud según la edad y raza de la vaca. Normalmente al palpar por vía transrectal se siente como un cuello de pollo. Al momento de la inseminación es la parte más importante del tracto, se requiere de mucha práctica y bastante experiencia para atravesar la cervix con la pistola de inseminación y tener éxito en la I.A. o en la T.E. no quirúrgica (ABS. 2006).

6. Vagina

Es un tubo de paredes mucosas que al momento del celo se encuentra lubricado por moco cervical. Cuando la vaca es preñada a través del sistema de monta natural el toro eyacula y deposita grandes cantidades de espermatozoides en la vagina. La vagina está conectada a la vejiga urinaria, por lo tanto, también interviene en la función de evacuar la orina. Está comprendida entre el cuello del útero y la vulva (ABS. 2006).

7. Vulva

Es la parte más externa del tracto, se puede apreciar a simple vista. Está formada por dos labios vulvares que forman la comisura dorsal y ventral, estos

toman una coloración roja (hiperemia) y aumentan de tamaño (edema) cuando la vaca está en celo por la acción de los estrógenos (Hincapié, J. 2004). Ç

C. LA SUPEROVULACIÓN

1. Definición e importancia

Becaluba, F. (2007), indica que el objetivo principal de los tratamientos de superovulación en el ganado bovino es producir un gran número de ovulaciones y obtener el máximo número de embriones transferibles que resulten en una alta probabilidad de preñez. Sin embargo, la respuesta a estos tratamientos es muy variable y difícil de predecir, debido a la influencia de la edad, raza, lactación, estado nutricional, estación del año y fase del ciclo estrual en el cual se inicia el tratamiento, por cuanto reporta que en un trabajo que incluyó 2048 recolecciones de embriones en donantes bovinas, obtuvo un promedio de 11,5 ovocitos/embriones y de 6,2 embriones transferibles por vaca.

Pero lo más importante que detectó en ese trabajo fue la gran variabilidad en la respuesta a la superovulación y en la producción de embriones. El 24% de las recolecciones no produjeron embriones viables, el 64% de las donantes produjeron menos embriones transferibles que el número promedio y el 30% de las recolecciones produjeron el 70% de los embriones.

2. Factores que intervienen en la respuesta a la ovulación múltiple

Gibbons, A. y Cueto, M. (2010), reportan que el factor intrínseco de cada animal juega un rol primario en la respuesta al tratamiento de ovulación múltiple. Estudios realizados en vacunos demostraron que solamente el 68% de las hembras respondió con embriones transferibles. El 32% restante incluía a las hembras sin respuesta a la estimulación ovárica, sin recuperación de embriones u ovocitos, o con recuperación de embriones no transferibles. Por consiguiente siempre se debe tener presente que un porcentaje de hembras puede no responder al tratamiento hormonal de ovulación múltiple. La

variabilidad individual a la respuesta hormonal de ovulación múltiple está condicionada por factores extrínsecos (raza, estación sexual, alimentación) e intrínsecos (foliculogénesis).

Moor, R. et al. (1984), manifiestan que tanto la tasa ovulatoria como el número de embriones viables producidos son caracteres relativamente inherentes a cada vaca donante. Los animales que tienen una respuesta baja en un tratamiento, responderán en forma similar en los tratamientos subsecuentes y los animales que responden bien inicialmente continuarán haciéndolo en esta forma.

Monniaux, D. et al. (1983), identificaron 2 tipos de vacas con respuesta pobre a la estimulación con gonadotrofinas exógenas.

- El primer tipo de vacas pertenecía a un grupo que tenía entre 50 y 200 folículos en crecimiento (70 mm de diámetro) por ovario, comparado con 600 o más, de vacas con respuesta alta. Este grupo de animales podría no haber tenido la cantidad suficiente de folículos para una respuesta adecuada, por lo que su condición sería inmodificable. Sin embargo, no deben descartarse los intentos para activar mayor número de folículos hacia el estadio antral.
- El segundo tipo de animales que no respondió, tenía un gran número de folículos, pero al momento de iniciar el tratamiento con gonadotrofina, una gran proporción de ellos ya había iniciado irreversiblemente el proceso de atresia. Las vacas pertenecientes a este último grupo podrían haber respondido bien si las gonadotrofinas hubieran alcanzado a estimular el ovario antes que el folículo dominante comenzara a inducir la atresia de los folículos subordinados. En este grupo de animales sería posible lograr buenas respuestas iniciando los tratamientos al comienzo de una onda folicular, cuándo los folículos dominantes y subordinados estuvieran en la fase de crecimiento.

Estos datos indican que existen factores fisiológicos que determinan esta variabilidad y que están influenciados por el estadio o viabilidad de los folículos

de una onda folicular el día que se comienzan los tratamientos superestimulatorios

a. La raza

La raza es un importante factor de variación, presentándose en las más prolíficas una mayor respuesta a la ovulación múltiple, embriones transferibles y crías nacidas (Gibbons, A. y Cueto, M. 2010).

La variabilidad individual es un factor siempre presente y no controlable en los tratamientos para inducir superovulación. Debe tenerse en cuenta por ejemplo la raza. De diferentes estudios han surgido por ejemplo que las vacas Holstein requerían una proporción mayor de FSH mientras que las vacas Charolais requerían una proporción mayor de LH para lograr la máxima respuesta superovulatoria. Se ha reportado también que los extractos pituitarios purificados como el Folltropin, han sido más eficaces que FSH-P cuando se utilizaron en condiciones de estrés por el calor, pero no fueron diferentes en condiciones ambientales con temperaturas moderadas. Estos estudios fueron realizados con vacas Holstein en Florida, USA (Meyer, J. et al. 2000).

Se han encontrado diferencias en la dosis que se debe utilizar para superovular vacas de diferentes razas. Los resultados de trabajos realizados ya hace unos años indicaron que la dosis de 400 mg NIH-FSH-P1 de FOLLTROPIN-V era la ideal para vacas Bos taurus (Bo, G. y Caccia, M. 2002).

Becaluba, F. (2007), manifiesta que en la actualidad ésta dosificación es aparentemente la ideal para vacas Holstein en lactancia, pero resultados de trabajo de campo con animales de carne indican que se puede obtener respuestas satisfactorias con dosis totales de 260 a 320 mg en vacas y de 200 a 260mg en vaquillonas.

Nasser, L. et al. (1993), indican que el ganado Bos indicus responde exageradamente a dosis altas de FSH y se han encontrado respuestas satisfactorias con dosis de 133 a 200 mg de folltropin-v en vacas Nelore y dosis

de 200 a 260 mg en razas sintéticas como Brangus y Braford. Las mismas tendencias y diferencias raciales se han encontrado utilizando otros preparados comerciales como el Pluset donde se han encontrado respuestas satisfactorias en *Bos indicus* cuando se redujo la dosis de 500UI a dosis que oscilaron entre 200 y 300 UI.

b. La edad

Hanselmann, D. (1995), efectuó un estudio retrospectivo en el que analizó la respuesta superovulatoria de 197 donantes, agrupándolas en tres categorías, hasta 5 años, de 6 a 8 años y mayores de 8 años. El promedio de embriones transferibles fue 5.2, 6.0 y 3.2, respectivamente.

Lerner, S. et al. (1986), sostienen que existe una interacción entre la edad de la donante y la dosis de gonadotrofina. Según su interpretación cuando animales jóvenes son tratados con dosis elevadas de gonadotrofina se produce una sobre estimulación ovárica donde muchos folículos comienzan a desarrollar pero pocos son capaces de ovular y la mayoría sufre luteinización o se atresian. Los motivos serían un insuficiente aporte sanguíneo a determinados folículos debido a limitantes físicas del ovario para albergar tantos folículos en crecimiento y por otro lado alteraciones endocrinas con excesiva producción de esteroides ováricos que interfieren en el propio desarrollo folicular y la ovulación.

En su trabajo observaron además que al aumentar la edad de la donante disminuyeron el número de ovulaciones, la tasa de fecundación y la calidad embrionaria. La disminución en el número de ovulaciones se debería a una menor disponibilidad de folículos capaces de responder a las gonadotrofinas exógenos. Al haber menos folículos en crecimiento, los niveles de inhibina bajarían y habría un aumento de la FSH endógena que haría que en estos animales, en cualquier momento de ciclo estral los folículos en crecimiento estuvieran en un estado de desarrollo más avanzado que aquellos folículos en animales más jóvenes.

En el estudio de Hasler, J. et al. (1983), reportaron que las tasas de preñez de embriones transferidos de vacas mayores de 15 años eran más bajas.

Moreira, F. et al. (2002), observaron un mayor número de embriones de mejor calidad en vacas no-lactantes que en vacas lactantes.

c. La nutrición

Hanselmann, D. (1995), demostró que la respuesta superovulatoria se correlaciona positivamente con la condición corporal, observando además que las donantes a campo tuvieron 2,2 embriones transferibles más que las estabuladas.

Willmott, N. et al. (1990), manifiestan que teniendo en cuenta que la alimentación con raciones con alto contenido energético eleva los niveles plasmáticos de ácido propiónico y glucosa, se ha hipotetizado que este aumento de la glucemia podría estimular a los centros hipotalámicos y consecuentemente incrementar la actividad ovárica.

Greve, T. et al. (1984), señalan que la suplementación con monensina puede constituirse en una alternativa de interés en la superovulación de vaquillonas, si se repite lo observado por quienes lograron en los animales suplementados una mayor respuesta a bajas dosis de FSH administradas para inducir ovulaciones dobles. Esto permitiría utilizar tratamientos de superovulación con dosis bajas de gonadotrofinas evitando así los fenómenos de sobre estimulación ovárica.

d. Otros factores

Chenoweth, P. (2007), indica que el semen tiene un efecto muy importante sobre el número de embriones obtenidos. Si en un lavado se recuperan solamente oocitos o embriones de mala calidad, no solo se puede deber a la respuesta superovulatoria sino a la calidad del semen.

Hasler, J. et al. (1983), reportan que en un estudio se analizaron registros de 1.000 donadoras de la raza Holstein. Los registros se dividieron entre dos grupos: vacas con buena fertilidad y vacas con baja fertilidad. Las vacas con buena fertilidad produjeron embriones más viables y con mejores tasas de preñez que las vacas de baja fertilidad (68 frente a 58%).

Jiménez, C. (2009), manifiesta que se debe considerar el tipo de FSH y la presentación comercial. Dentro de los productos varía la potencia, dada en muchos casos por la relación FSH/LH. Los resultados también pueden variar según la dosis total, si se usan dosis decrecientes o constantes, los intervalos y por cuántos días se realiza el tratamiento.

3. Selección de las hembras donantes

Reyes, P. (2010), indica que la selección de donadoras es muy importante, ya que de ello depende el éxito de obtener un mejoramiento genético, sin embargo es muy importante hacer una rigurosa selección para tener la facultad de dar un buen número de embriones viables. Es por esto que la medida de las posibilidades en la preselección de las futuras donantes para un programa de TE, deberá ser sistemática y muy estricta en lo que concierne a calidad y estado fisiológico con el fin de asegurar respuestas ováricas altas y estables.

Ávila, J. (2009), reporta que es muy importante que la donadora sea fértil que por lo menos haya tenido un parto normal, las mejores respuestas de superovulación y calidad de embriones, provienen de aquellas donadoras que son fértiles y tienen un comportamiento normal, por consiguiente se debe tener en cuenta lo siguiente:

- Revisión estricta de su aparato genital por vía rectal y vaginal.
- Debe presentar al menos 2 celos normales previos a la superovulación (18 a 23 días).
- No es recomendable la programación de vacas donadoras con alteraciones patológicas en los órganos genitales, porque los resultados serán mediocres o negativos.

- Deben presentar una condición corporal aceptable, entre 2.5 y 3 puntos en la escala del 1 a 5.

González, R. (2012), sostiene que el elemento más importante que prima en la selección de una vaca donadora, es el mejoramiento genético y consecuentemente un mayor valor de mercado de las crías. Los índices de una vaca, los cuales son la medida de la habilidad de una madre para transmitir la capacidad de aumentar o disminuir la producción de carne o de leche a su descendencia pueden perfectamente ser registrados. Igualmente las ganancias de pesos de las crías pueden ser usadas para la selección de madres superiores en la producción de carne. Desafortunadamente esos parámetros son frecuentemente ignorados, resultando las crías de variables méritos desde el punto de vista genético.

La Unión Ganadera Regional de Jalisco (UGRJ, 2012) www.ugrj.org.mx, indica que el valor de la donadora puede ser definido de acuerdo a diferentes criterios según los beneficiarios. Sin embargo, en el caso de la aplicación práctica de la técnica para el mejoramiento genético del ganado, se debe escoger a las vacas más productivas como donadoras. Además, estas vacas, deben de cumplir con los siguientes requisitos:

- No presentar enfermedades hereditarias
- Tener excelente historial reproductivo y salud
- Alto valor en el mercado
- Ciclos estrales regulares
- No tener enfermedades que afecten la fertilidad
- No ser demasiado viejas.

a. Merito genético - raza

Becaluba, F. (2007), menciona que siendo el efecto directo de la transferencia de embriones, el aumento de la reproducción de vacas individuales en la población; es indispensable seleccionar animales genéticamente superiores (vaca elite). La selección de hembras donantes es más difícil que la del

semental, pues pocas tienen suficiente progenie para establecer su potencial, para tal efecto se deberá considerar los siguientes datos:

- Pedigrí, son los antecedentes del individuo, bisabuelos, abuelos, padres, hermanos e hijos.
- Antecedentes de no transmisión defectos y características indeseables.
- Clasificación lineal: apariencia general 30%, temperamento lechero 20%, capacidad corporal 20%; y, sistema mamario 30%.

b. Manejo sanitario de las vacas donadoras

Hinshaw, R. (2007), manifiesta que las donadoras de diferentes razas bovinas especializadas en producción de carne o leche, en todos los casos se someten a un completo examen clínico y reproductivo por el técnico responsable del programa. El examen clínico de aparato reproductor es un factor clave. La aplicación correcta de los métodos técnicos (sincronización de celos, I.A., superovulación, T.E., tratamiento del anestro posparto, y métodos de diagnóstico), dependen del conocimiento y actualización en fisiología reproductiva y farmacología de los agentes terapéuticos, para relacionar los individuos con el medio ambiente y lo que el productor desea obtener de estos factores. Los métodos de la T.E., solamente pueden ser aplicados con éxito en animales sanos y fértiles.

Galindo, R. (2004), dice que la Transferencia de Embriones es posible de aplicar en donadoras y receptoras vacías normales y que demuestren síntomas y signos de actividad ovárica. Como regla, solamente receptoras normales son aceptadas en el programa. Las donadoras con problemas reproductivos son examinadas y valoradas para aceptarse en el programa en el caso de un animal muy especial.

Gazque, R. (2008), señala que las donadoras deberán conservarse en perfecto estado de salud, por lo que se les deben practicar en forma rutinaria (cada 30 a 90 días) exámenes clínicos y de laboratorio, para certificar que estén libres de enfermedad, es infecto-contagiosas como: Brucelosis, Leptospirosis, Vibriosis,

Tricomoniasis, Tuberculosis, IBR, BVD, y parásitos internos y externos, para lo cual deberá llevarse también un estricto calendario de vacunaciones y desparasitaciones de acuerdo a la región donde se ubiquen los animales.

Gorlach, A. (2005), menciona que, muchos problemas se han visto involucrados durante la etapa de gestación de las vacas ya sean por problemas alimenticios, de medio ambiente, e incluso por afectación de varias enfermedades que afectan directamente al desarrollo normal del embrión.

Respecto a esto indica que, es necesario determinar qué tipo de enfermedades están presentes en las hembras, ya que los embriones además de transportar una valiosa información genética, también pueden ser una importante fuente de diseminación de enfermedades reproductivas, tales como la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR), el virus de la Diarrea Viral Bovina (DVB), Leucosis Viral Bovina, agentes bacterianos como *Brucella abortus*, *Campylobacter*, *Leptospira*, y de otras bacterias como *Streptococo*, *Actinomicetes*, *E. coli* ya que el agente infeccioso va a estar presente en las células embrionarias o asociado a la zona pelúcida. Los embriones salen de la zona pelúcida entre los ocho y los nueve días de edad. Walenciak, D. (2005), recomienda vacunar a las vacas donantes contra agentes virales, bacteriológicos y desparasitar, al menos un mes antes de la superovulación.

Caiza, F. (2010), señala que el control sanitario debe ser muy riguroso en cuanto a parasitosis como Tricomoniasis, Neosporosis, principalmente en las enfermedades que influyen en la superovulación y transferencia de embriones.

Cuadro 2. CALENDARIO DE VACUNACIÓN AL AÑO.

Meses	Enfermedad	Tipo vacuna	Edad	Vacunación	Revacunación	Observación
Ene.	Aftosa	Agro calidad				
Feb.	Carbunco-septicemia-edema	Sintosep	> 3 meses	Si	Anual	Bioseguridad
Mar.	Virales IBR-DVB-VSB-PI3-leptospira	Blindogan	> 3 meses	Si	Si (jóvenes)	Bioseguridad manejo
Abr.	Desparasitar					
May.						
Jun.	Desparasitar					
Jul.	Aftosa	Agro calidad				
Ago.						
Sept.	Muestreo de sangre					Evaluar brucela neospora y leucosis
Oct.						
Nov.	Desparasitar					
Dic.	Aftosa					

NOTA: Brucela cada mes a hembras que estén entre 5 a 7 meses con Cepa 19.
 Los meses vacíos se pueden hacer desparasitaciones previo examen de laboratorio.
 Vacuna para Neospora se realizara a todas las vacas preñadas cada mes, con intervalos de 20 días de aplicación de cualquier otro producto.
 Fuente: Caiza, F. (2010).

c. Alimentación de las vacas donadoras

Curtis, J. (2009), indica que el establecimiento y mantenimiento de la salud y eficiencia reproductiva de un animal está altamente correlacionado con la nutrición apropiada. Se debe tener cuidado para cumplir todos los requisitos mínimos de PC, nutrientes totales digestibles TND, minerales y vitaminas.

Palma, G. (2001), reporta que la alimentación y el estado nutricional de la vaca donante tiene influencia tanto en la tasa de ovulación y fecundación como la viabilidad de los embriones. La nutrición de las vacas receptoras es menos crítica que las donantes, estas pueden ser alimentadas únicamente con forrajes y minerales, y los resultados en la T.E. pueden ser exitosos siempre y cuando se les provea de un buen manejo.

1) Energía

Ramón, G. (2007), manifiesta que usualmente, cuando hablamos de dar energía, hablamos de balanceados ricos en granos (maíz, sorgo, cebada y, en menor grado, avena), pero también de problemas asociados, como acidosis (rumenitis), abscesos hepáticos, laminitis (pietín), etc., por lo que una fuente de energía muy interesante para aumentar la densidad energética de la dieta de las vacas donantes, sin aumentar los riesgos de dichos problemas, es la grasa en forma de aceites vegetales (poroto de soja, semilla de algodón, etc.) y/o grasas protegidas, también llamadas "grasas by pass". El agregado de grasas a las raciones estaría particularmente indicado cuando ofertamos forrajes voluminosos de baja calidad de distinto tipo, y además cuando las vacas caigan en su consumo diario de materia seca, por ejemplo, por estrés calórico. Además de aumentar la densidad energética de la dieta, sin caer en los problemas de salud mencionados, las grasas influirán sobre el desarrollo folicular de vacas en programas de transferencia embrionario, aparte de poder asumirse que esas grasas tendrán un efecto positivo sobre la calidad de los embriones, por lo que su inclusión en la dieta estaría particularmente indicada.

Sartori, R. (2006), relata que, cuando las vacas están en Balance Energético Negativo (BEN) las concentraciones sanguíneas de ácidos grasos no esterificados (AGNE) aumentan, mientras que los IGF-I, glucosa e insulina están bajas. Esa alteración en los niveles sanguíneos de estos metabolitos y hormonas esta generalmente asociada al comportamiento de función ovárica y fertilidad.

Roche, et al. (2000), manifiestan que la cetosis, resultado de un déficit en el balance energético, es perjudicial para el crecimiento folicular y la actividad del cuerpo lúteo.

2) Proteína

Ramón, G. (2007), indica que respecto a la nutrición proteica, se ha demostrado en numerosos trabajos de investigación y a campo la relación

proteína: problemas reproductivos. Altos niveles de proteína de alta degradabilidad ruminal pueden llevar a una menor eficiencia reproductiva, ya que se verá seriamente afectada la nidación o directamente la vida del embrión, así como también los niveles circulantes de progesterona.

<http://www.salesganasal.com> (2012), indica que el impacto negativo del exceso de proteína en la dieta, principalmente de proteína soluble y proteínas altamente degradables ha sido bien documentado. Sin embargo este tópico es aún controversial, debido a que algunos estudios no han encontrado un efecto negativo del exceso de proteína sobre la fertilidad del ganado. El mecanismo por el cual el exceso de proteína puede afectar la fertilidad puede relacionarse con el aumento en la producción de amonio ruminal y por ende urea en sangre. El exceso de urea puede tener un efecto negativo potencial sobre los órganos reproductivos los niveles hormonales, el embrión, los espermatozoides y el óvulo.

3) Vitaminas y minerales

Entre los minerales y antioxidantes que se pueden suplementar a la vaca donadora, para que esta esté en condiciones reproductivas óptimas para la superovulación tenemos:

- **Fósforo:** Necesario para la transferencia y uso de la energía en procesos orgánicos, incluidos los procesos reproductivos y puede provocar la atonía uterina o contracciones anormales (Rocha y Córdova, 2008). Mantener la proporción de 1,5:1 a 2,5:1 de Calcio: Fósforo es sumamente importante, ya que se ha demostrado que por encima de una relación de 2,5:1 la incidencia de retención placentaria y otros problemas reproductivos aumentan (Manspeaker, 2005).
- **Cobalto:** El Cobalto forma parte de la estructura de la vitamina B12 (cobalamina) la cual es necesaria para la síntesis de ADN y ARN, y también para la producción de glóbulos rojos, las células que llevan oxígeno alrededor

del cuerpo para ser utilizadas en la producción de energía y ATP. Cuando no hay suficiente Cobalto en la dieta se puede producir anemia (Merck, 2000),

- Zinc: Ha sido demostrado que la disminución de niveles de Zinc deteriora la actividad de las células Natural Killer, la fagocitosis de macrófagos y neutrófilos, y ciertas funciones tales como la quimiotaxis y el estallido respiratorio. Los factores que afectan la capacidad migratoria de los neutrófilos determinarían un menor número de éstos en los placentomas y, por consiguiente, una menor cantidad de enzimas proteolíticas disponibles para la digestión de la unión materno-fetal. También se debe tener en cuenta su papel como cofactor de la Colagenasa, lo que implica que posiblemente una deficiencia de Zinc afectará la actividad de esta enzima de la misma manera (Silva et al, 2002).

- Yodo: Su deficiencia disminuye el metabolismo basal, pues es el principal elemento de las hormonas tiroideas (tiroxina y triyodotironina) asociadas con muchos procesos importantes, entre ellos la reproducción, el crecimiento, el desarrollo y el funcionamiento neuromuscular. Al disminuir el metabolismo, los tejidos consumen menos oxígeno, disminuye el crecimiento y la actividad de las gónadas, puede llegar a generar problemas al parto y problemas neuromusculares (Church et al, 2002).

- Selenio: Ha sido demostrado que la deficiencia de Selenio provoca problemas musculares no sólo en las crías, sino también en los adultos (Manspeaker, 2005). El selenio también induce a la migración de leucocitos y células blancas y forma parte de la enzima glutatión peroxidasa, funcionando como un factor de migración celular e interviniendo en la capacidad fagocítica (Silva, 2002). La glutatión peroxidasa es responsable de la protección de la membrana de las células que funcionan en un presencia de oxígeno, interviene en la cascada de reacciones que catalizan la formación de prostaglandinas, leukotrienos, prostaciclina y tromboxanos, se relaciona con el normal funcionamiento del sistema inmunológico y con la integridad funcional del tracto reproductivo (Ceballos et al, 1999).

- Vitamina E: Junto con la glutatión peroxidasa reduce los efectos del estrés oxidativo sobre las células vivas. Previene la formación de peróxidos grasos mediante el secuestro de radicales libres antes que estos inicien su actividad. Su función biológica recae en la inhibición de fosfolípidos anormales para controlar los procesos oxidativos a nivel de membrana celular. La vitamina E participa en la síntesis de coenzima Q, y en la síntesis y metabolismo de ácidos nucleicos (Reinoso y Soto, 2009).

4. Tratamientos hormonales para la superovulación

Existen varios protocolos de superovulación, estos pueden variar en tiempo, cantidad de dosis y al manejo que se le dan. Al seguir con las indicaciones de los protocolos se debe tener la mayor disposición y responsabilidad, ya que al cometer un simple error se estaría perdiendo todo el tratamiento que se le está suministrando a la vaca (Orellana, J. y Peralta, E. 2007).

a. Tratamiento tradicional de superovulación en bovinos

Cupps, P. (1991), indica que los programas de superovulación en el ganado bovino son comenzados durante la fase luteal media, preferentemente entre los días 8 y 12 después de observado el celo. Este esquema para superovular vacas donantes derivó de experimentos y pruebas de campo realizados durante la década del 70 en que se concluyó que los tratamientos superestimulatorios comenzados en el día 9 o 10 después de detectarse el celo resultaban en una mejor respuesta superovulatoria que aquellos iniciados antes (día 2 a 6) o después (día 12 a 13). Su esquema de aplicación se reporta en el Cuadro 3.

Cuadro 3. ESQUEMA TRADICIONAL DE SUPEROVULACIÓN EN BOVINOS.

Día	Donante	Receptoras
0	Detección de celo	
10	Tratamiento con gonadotrofinas	
11	Tratamiento con gonadotrofinas	PGF2a (mediodía)
12	Tratamiento con gonadotrofinas + PGF2a	
13	Tratamiento con gonadotrofinas	
14	AM: Detección de celos PM: 1ra. IA	AM: Detección de celos
15	AM: 2da. IA	
21	Recolección de embriones	Transferencia

Fuente: Becaluba, F. (2007).

b. Tratamiento con FSH

De acuerdo a González, R. (2012), indica que el tratamiento puede ser iniciado el día 10 ó 12 (día 0 = celo), del ciclo estrual natural de la donadora. Las dosis de FSH se aplican en una forma decreciente en niveles de 6, 5, 4, 3 y 2 mg, dos veces diarias. En el Cuadro 4, se presenta dos ejemplos de regímenes superovulatorios con FSH. La prostaglandina es administrada rutinariamente (25-35 mg de PGF2 α o 500 mcg de su análogo) al momento de la 5ta o 7ta inyección de FSH la cual es seguida por el celo y la ovulación. El intervalo entre la administración de PGF2 α y el inicio del estro es de 12 a 24 horas siendo más corto en animales superovulados que en aquellos que ovulan en forma espontánea, tanto en novillas como en vacas. Es por eso que las receptoras deberían ser inyectadas con PGF2 α 24 horas antes que las donadoras, cuando se utiliza este método previo de sincronización.

Las respuestas a los regímenes exógenos de FSH alcanzan rangos desde 0 hasta múltiples ovulaciones con un promedio de 10 a 12. Aparentemente no hay diferencias en respuestas entre regímenes de 4 a 5 días. Las novillas requieren dosis menores que animales viejos. Las inseminaciones se realizan 10 a 12 horas (1^a. I.A.) y 24 horas (2^a.I.A.) después del inicio del celo.

Cuadro 4. TRATAMIENTO SUPEROVULATORIO CON FSH.

Día	Dosis iguales / 4 Días	Dosis decrecientes / 5 Días
3 (6-14 ciclo)	25 mg PGF2 α	25 mg PGF2 α
0	CELO	CELO
1 (8–12 día)	5 mg FSH AM y PM	6 mg FSH AM y PM
2	5 mg FSH AM y PM	5 mg FSH AM y PM
3	5 mg FSH AM y PM + PGF2 α	4 mg FSH AM y PM
4	5 mg FSH AM y PM	3 mg FSH AM y PM + PGF2 α
5	CELO	2 mg FSH AM y PM
6	I.A. 12 y 24 h	CELO – I.A. 12 y 24h

Tratamiento I = régimen de 4 días con dosis iguales de 5 mg c/u

Tratamiento II = régimen de 5 días con dosis decrecientes

Fuente: González, R. (2012).

d. Tratamiento con progestágenos + PGF2 α

Martínez, D. (2012), indica que se basan en la inserción de dispositivos intravaginales liberadores de progesterona (DIV), en cualquier momento del ciclo estral, dejar un tiempo de permanencia variable y aplicar PGF2 α en un momento próximo a la retirada del dispositivo. Los métodos más convencionales incluyen la permanencia del dispositivo durante 7 a 9 días con aplicación de la PGF2 α un día antes de la retirada o bien al mismo tiempo, cuando simplificar el procedimiento es prioritario. Este tipo de métodos mejoran la eficiencia de la sincronización respecto al uso de la PG únicamente.

El tratamiento hormonal más común para la sincronización de una nueva onda folicular para superovulación ha sido la administración de 5 o 2,5 mg de estradiol-17 β o 2,5 mg de benzoato de estradiol y 100 o 50 mg de progesterona por vía intramuscular en el momento de la aplicación del dispositivo intravaginal (revisado en Bó et al., 2002, 2006; Mapletoft, 2002). El tratamiento con estradiol provoca la supresión de la liberación de FSH y la atresia folicular.

La prolongación del tratamiento con el DIV conduce a un mayor tamaño del folículo preovulatorio y mayores concentraciones de progesterona subsecuentes, aunque menores tasas de gestación tras la inseminación,

debido al envejecimiento del folículo (Martínez, D. 2012).

En el protocolo de superovulación con CIDR®, al día 0 se hace la aplicación a las vacas donadoras, las que presentan un CL definido se les coloca el implante CIDR y 2 ml de BE, luego al día 4 se inician las aplicaciones de FSH (AM-PM), después los días 8 y 9 se realiza la IA y al día 15 la colecta de embriones (Orellana, J. y Peralta, E. 2007).

e. Tratamiento con eCG o PMSG

Gibbons, A. y Cueto, M. (2010), reportan que la gonadotrofina sérica de yegua preñada (PMSG) o gonadotrofina coriónica equina (eCG), posee actividad FSH, y en menor medida, actividad LH. Se utiliza al final de los tratamientos con esponjas intravaginales con progestágenos para la sincronización de celos. En los bovinos, se recomienda la colocación de una esponja intravaginal y la administración de eCG al momento de su retiro. La dosis de PMSG varía según la raza y el estado fisiológico reproductivo (valores indicativos: 2000 a 4000 UI).

De acuerdo a González, R. (2012), la PMSG puede ser inyectada por vía subcutánea o intramuscular en el día 16 ó 17 del ciclo estrual normal. Las dosis van desde 1500 a 3000 UI, pero de 2000 a 2500 UI son comúnmente usadas. Cuando se emplean en combinación con la PGF2 α , la PMSG administrada entre el día 8 al 15 del ciclo estrual debe ser seguida por la prostaglandina 48 a 72 horas después (Cuadro 5). La inyección de PMSG inicialmente favorece un efecto luteotrófico, que ha sido relacionado con la actividad de la hormona luteinizante. La LH presumiblemente es la responsable de las ovulaciones prematuras de folículos de gran tamaño presentes al momento de la inyección de PMSG.

Cuadro 5. TRATAMIENTO SUPEROVULATORIO CON PMSG.

Día	Tratamiento I	Tratamiento II
0	25 mg PGF2 α	25 mg PGF2 α
3	Estro	Estro
13 AM		2500 UI PMGS
14 AM	2500 UI PMGS	
16 AM	35 mg PGF2 α	35 mg PGF2 α
PM	20 mg PGF2 α	20 mg PGF2 α
18	Estro	Estro
	IA 8 – 10 horas luego del inicio del estro repetir 18 – 24 h o servicio natural poner la donadora con el toro cada 8 horas por 10 minutos hasta que lo rechace	IA 8 – 10 h luego de iniciado el celo, repetir a las 18 – 24 h o servicio natural por exposición de la donadora al toro cada 8 horas por 10 minutos hasta que lo rechace.

Fuente: González, R. (2012).

5. Gonadotrofinas utilizadas para inducir superovulación

Becaluba, F. (2007), indica que en la inducción de superovulación se utilizan tres tipos de gonadotrofinas diferentes para inducir la superovulación en donantes bovinas: extractos de pituitaria de animales domésticos, gonadotrofina correnca equina, y gonadotrofina menopáusica humana.

a. Extractos de pituitaria

Cupps, P. (1991), señala que los extractos de pituitarias son los más utilizados. Estos extractos contienen altas cantidades de FSH y cantidades variables de LH, dependiendo del producto.

Lindsell, C. et al. (1986), sostienen que la vida media de la FSH es de 5 horas por lo tanto se deben administrar cada 12 h por vía intramuscular.

Bo, G. y Caccia, M. (2002), manifiestan que los tratamientos consisten en dosis decrecientes o constantes durante 4 a 5 días. Se inyecta PGF2a a las 48 h

(tratamiento de 4 días) o a las 72 h (tratamiento de 5 días) de iniciado el tratamiento, sin existir cambios significativos en la respuesta superovulatoria.

b. FSH-P

Cupps, P. (1991), indica que la FSH-P, era un extracto de pituitaria de animales domésticos que se encontraba en el mercado hasta hace unos años atrás. Debido a que es un extracto no purificado contenía cantidades muy variables de FSH y LH, con diferencias significativas entre las partidas. Bo, G. y Caccia, M. (2002), reportan que la dosis total a utilizar variaba entre 28 y 50 mg.

c. Folltropin-V

Bo, G. y Caccia, M. (2002), indican que es un extracto pituitario porcino al que se le ha extraído aproximadamente el 80% de la LH. La presentación sería: 1 ampolla con 400mg NIH-FSH-P1.

<http://www.BionicheAnimalHealth.com>. (2012), señala que el Folltropin-V, es una folitropina de extracto purificado obtenido cuidadosamente seleccionando glándulas pituitarias porcinas. Se liofiliza para mantener la potencia en condiciones normales de almacenamiento. Cada frasco de 20 ml contiene FSH equivalente a 400 mg NIH-FSH-P1. Cuando se reconstituye según instrucciones de la etiqueta de la solución final contiene 20 mg / ml. Folltropin ®-V diluyente es un frasco de 20 ml de solución inyectable de cloruro de sodio. Se lo utiliza en novillas o vacas reproductivamente maduras para inducir una superovulación.

d. Ovagen

<http://www.viarural.com.ar/viarural.com.ar>. (2013), reporta que el Ovagen, es un extracto pituitario ovino purificado con muy poca LH. Cada frasco de 20 ml contiene 17.6 mg NIADDK-o FSH-17 de FSH ovina. La dosis total es de 14 a 20 ml y se recomienda administrarlo en 8 dosis constantes cada 12 h.

6. Fecundación de la hembra donante

a. Inseminación artificial de la donante

Es posible tener éxito con tan sólo dos inseminaciones si se programan dependiendo del comportamiento del animal donante (del comienzo del celo y de su duración), debiéndose llevar a cabo la primera inseminación de 8 a 10 horas después del comienzo del celo y la segunda de 10 a 14 horas después, pero si la donadora aún manifiesta receptividad sexual al momento de la segunda inseminación es recomendable darle una tercera inseminación 10 a 12 horas después (Escurra, L. 2001).

Reyes, P. (2010), indica que realizando un servicio a las 12 horas y repitiendo a las 24 después de detectado el celo, esto es debido a que la ovulación tiene lugar en momentos diferentes en un intervalo de tiempo amplio, si la superovulación se ha inducido con FSH es conveniente aplicar en el momento de la segunda inseminación una dosis de 3.000 a 5.000 UI de eCG (hormona gonadotropina coriónica equina), para reducir el tiempo en el que se suceden las ovulaciones.

Para la primera inseminación de las donadoras se puede aplicar la llamada "Regla AM-PM", detectando celos después del amanecer y poco antes del atardecer. Cuando las donadoras son de raza Holstein y el celo se detectó en la mañana, la primera inseminación se da ese mismo día en la tarde y la segunda. Al día siguiente en la mañana (Asprón, P. 2001).

González, R. (2012), manifiesta que cuando se trata de semen de alto costo se debe modular el uso del mismo en función de la intensidad del celo y desarrollo de la estructura folicular. Cuando el celo se adelanta 24 horas o más de la fecha prevista deberá emplearse semen más económico y preferiblemente una sola inseminación. Estos celos adelantados generalmente son el resultado de una falla en el proceso superovulatorio. Semen de dos o más toros y/o razas (inseminación heteróloga) es también utilizado. Siendo necesario la tipificación sanguínea de los terneros. Se recomienda emplear técnicas higiénicas y

fundas estériles durante el servicio. Si durante o después del servicio se observa un moco turbio o residuos purulentos, aplique penicilina y estreptomicina (5.000.000 UI y 2.500 mg respectivamente) intramuscular 24 horas después del último servicio.

b. Calidad del semen

Para lograr una buena tasa de fertilización y por lo tanto un mayor número de embriones transferibles. Deberá emplearse semen de buena calidad biológica, evaluando previamente con base en la concentración y motilidad espermática progresiva del lote del semen utilizado. Los catálogos del sementales de algunas compañías señalan que si el semental es clasificado de baja, mediana o alta fertilidad (determinada mediante pruebas de penetración espermática de óvulos sin zona pelúcida); que no deben emplearse en programas de transferencia de embriones (Asprón, P. 2001).

D. COLECTA DE EMBRIONES

1. Importancia

Orellana, J. y Peralta, E. (2007), señalan que la colecta de embriones se hace al día 7 después de la primera I.A. de la vaca donadora, mediante un lavado uterino transcervical. En este momento se puede encontrar embriones en estadios de mórula y blastocisto, estos son más estables que los demás estadios, lo que hace posible que sean transferidos directamente (transferencia en fresco) o que resistan a actividades como la congelación y micromanipulación. El hecho de establecer a nivel mundial que la colecta se debe hacer el día 7 después de la primera I.A., estandariza la valoración y manipulación de los embriones para la comercialización, además facilita la sincronización de las receptoras.

Gibbons, A. y Cueto, M. (2010), señala que la metodología empleada para la obtención de embriones consiste en inyectar un medio líquido para producir una corriente de arrastre (lavado o flushing) a través de los cuernos uterinos.

Se utiliza un medio comercial en base a PBS (Solución Buffer Fosfato), al que se le debe adicionar un 10% de suero adulto bovino, ovino o caprino inactivado. Para la obtención de suero, se sangra en forma aséptica con material esterilizado. El suero se centrifuga a 2000 g durante 15 minutos. Se toma el sobrenadante y se realiza una segunda centrifugación. Se filtra por membrana de 0.22 µm. La inactivación de la proteína complemento se realiza en baño de agua a 56 °C durante 30 minutos. El suero filtrado inactivado se puede conservar durante un año a -20 °C.

González, R. (2012), indica que los embriones bovinos tienden a descender hasta el útero alrededor del día 4-5 (estro=día 0) y salir de su zona pelúcida entre los días 8 a 10. Consecuentemente, la mayoría de las recolecciones no quirúrgicas deberán hacerse entre los días 6 a 8 (Cuadro 6).

Cuadro 6. MOMENTO DE RECOLECCIÓN NO QUIRÚRGICA DE EMBRIONES.

Días Post-Inseminación										
Fecundación			Permanencia en Trompas		Arribo y permanencia en útero					
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Inoportuno					Temprano		Ideal		Tarde	

Fuente: González, R. (2012).

2. Materiales necesarios para la colecta de embriones

Orellana, J. y Peralta, E. (2007), señalan que los materiales necesarios para la colecta de embriones, son los siguientes:

- Mesa para la instalación de materiales. Debe ser lavada y desinfectada previo a su uso. Se puede lavar con detergente y agua normal, luego se desinfecta con una solución de clorhexidina y agua.
- Ecógrafo. Es instalado sobre la mesa para materiales, en este caso, es utilizado para ver la cantidad de CL en cada ovario y hacer una evaluación de la calidad de trabajo que se realizó; evaluar si se colocaron

las dosis de hormonas adecuadas en el momento requerido, evaluar la eficiencia del equipo de trabajo, tanto la del técnico que realiza el lavado como la del encargado de buscar e identificar los embriones en el laboratorio. Contando los CL se puede estimar cuantos embriones deben salir al final de todo el proceso de colecta y búsqueda de embriones. Cabe aclarar que se puede estimar la cantidad de embriones pero no la calidad o grado de los mismos. Existen casos en los cuales el número de embriones es alto, pero solo dos o tres son de buena calidad y están aptos para la transferencia.

- Guantes de palpación, gel usado como lubricante, papel de limpieza, jeringas y agujas para la aplicación de Lidocaína como anestésico.
- Catéter de Folley. Es un tipo de sonda que permite la entrada de medio de lavado al cuerpo del útero y las trompas de Falopio; al igual que permite el drenaje del medio, haciendo una evacuación de los embriones al ser arrastrados por el medio de lavado. Existen de diferentes medidas, estas van desde 16 hasta 22 pulgadas, por lo general las medidas menores son utilizados en novillas, ya que tienen un tracto reproductor más pequeño. Al hacer un corte transversal de un catéter de Folley se puede apreciar que en el centro tiene un orificio, seguido hacia la parte exterior, tiene una capa sólida, luego hay otro espacio libre y termina con otra capa sólida. La parte anterior del catéter tiene una forma redonda y un orificio que lo atraviesa transversalmente, cuando este es introducido en el tracto, esta parte queda dentro del cuerpo del útero y para que no se salga se infla inyectándole aire o medio de lavado desde el exterior, a esto se le conoce como “Balón” debido a que la parte anterior adquiere la forma de un pequeño balón. Es por eso que la parte posterior termina en una V, una entrada es para introducir el estilete y la otra para inflar el balón.
- Estilete. El estilete se introduce en el catéter Folley por el orificio central que este tiene para que le de rigidez y pueda pasar por la cérvix, al momento de hacerlo se debe tener el cuidado de no sacar la punta del

estilete por el orificio transversal que tiene el catéter en la parte posterior, ya que puede lastimar las paredes de la cervix. Este es uno de los problemas más comunes que se presenta con personas que están aprendiendo la técnica.

- Filtro. Es un recipiente de boca ancha y fondo angosto, posee una tapadera con dos orificios; uno pequeño que es para la entrada de aire, necesario al momento de drenar el medio y otro que va conectado a la manguera que viene de la conexión con el catéter de Folley y el medio de lavado. La reddecilla encargada de filtrar está ubicada en la pared del recipiente, esta tiene una ligera inclinación hacia la parte interna del recipiente. Después de la reddecilla hay un orificio de salida, usado para drenar el medio del filtro. Los embriones quedan atrapados por esta reddecilla. Cuando se termina la colecta el filtro se pasa al laboratorio.
- Medio de lavado. Se usa entre uno o dos litros de Suero Fetal Bovino (SFB) al 1% de albúmina como medio de lavado. Al momento de hacer el lavado la bolsa que contiene el suero debe estar en una parte alta, ya que todo el sistema trabaja por medio de la fuerza de gravedad. Antes de ser usado el suero debe pasar por el baño María, y asegurarse que su temperatura sea igual a la temperatura corporal de la vaca.

3. Colecta de embriones no quirúrgica

Según Reyes, P. (2010), la colecta de embriones no quirúrgica se basa en el siguiente procedimiento:

- El primer paso en la recuperación no quirúrgica es palpar los ovarios vía rectal y estimar el número de cuerpos lúteos. Es muy difícil acatar el número de cuerpos lúteos, sobre todo cuando la donadora está súper estimulada, ovarios del tamaño de una naranja, el mejor estímulo es más o menos el tamaño de una mandarina o el tamaño de un huevo de gallina, cuando existen 2 a 3 cuerpos lúteos por ovario se pueden palpar y predecir el número de embriones que se puede colectar.

- Las donadoras se recomienda ayunarlas 12 horas antes de la colecta, para evitar, que estén defecando y contaminando mangueras y sondas.
- Es recomendado para este procedimiento, que la cola, el sacro y la zona vulvar, sean lavadas y desinfectadas con yodo-povidona y luego con alcohol al 70% para disminuir el estrés del animal y la presión del esfínter anal sobre el brazo del operador, se aplican de 5 a 7 ml de xilocaína al 2% en el espacio epidura, así como una dosis de tranquilizante de Promacina 10 mg intravenosa, ya que la cola esté flácida. es el momento de empezar.
- El cérvix uterino, está cerrado, se cateteriza con un dilatador cervical metálico atraumático hasta llegar al cuerpo del útero (bifurcación de los cuernos). Se introduce una sonda Foley de calibres (14-16-18) según el tamaño, la edad de donadoras- 14 para novillas.- 16 para vacas o vaquillas y del número 18 hasta el 20 para vacas muy grandes y de cuernos gruesos, el globo del catéter es inflado con 5 a 12cc de solución salina fisiológica estéril o bien aire, cuando la punta de la sonda, esté a la mitad del cuerno uterino. Algunas veces se encuentra dificultad para pasar el cerviz, sobre todo en novillas de algunas razas. Es necesario hacerlo con todo cuidado y paciencia, es muy importante para no lastimar el cérvix o la mucosa uterina.
- El líquido del lavado, saldrá sanguinolento o se perderá dentro del útero, o caerá en la cavidad abdominal. Se utiliza una manguera estéril larga que está en circuito cerrado, un extremo penetra en el frasco o bolsa, que contiene medio lavado, otro extremo penetra en la sonda Foley y el otro extremo es conectado a un filtro, colector de embriones.
- La bolsa o frasco, que contiene 1 o 2 litros de medio de colecta, se coloca a una altura de 80 a 100 cm sobre el nivel de la vaca, para que el líquido pueda penetrar por gravedad.
- En la palpación del útero, que es aproximadamente una preñez de 35 a

40 días, se da un ligero masaje al cuerno, que contiene el líquido del lavado, para tratar de desprender los embriones, que están en la mucosa uterina, estos van a caer a un filtro colector y concentrador de embriones, este filtro posee una malla de 70 micras y retiene embriones ya que estos miden de 140 a 160 micras.

Una vez terminado de lavar los cuernos uterinos, las donadoras, son inyectadas con una dosis doble de prostaglandina y se repite de 12 a 14 días después. El objetivo de esto es evitar procesos inflamatorios uterinos o gestacionales múltiples ya que algunos embriones pueden permanecer aún en los oviductos. Se puede aplicar un antibiótico no irritante, como preventivo de alguna contaminación (Ávila, J. 2009).

4. Búsqueda de embriones

Gibbons, A. y Cueto, M. (2010), señala que el medio de lavado recolectado es vertido en una placa de búsqueda de embriones. La búsqueda se realiza bajo lupa con platina térmica a 38 °C. Se recomienda efectuar siempre una segunda lectura de la placa. A medida que se identifican los embriones, los mismos son aspirados mediante micropipeta y colocados en una caja de Petri con un medio de conservación enriquecido con suero al 20%, resguardo de la luz y a temperatura de laboratorio. Una vez finalizada la búsqueda, se procede a la clasificación de los embriones. De ser posible es importante utilizar una campana y aire filtrado. Cabe recordar que se debe trabajar en condiciones estrictas de esterilidad.

Según Reyes, P. (2010), lo primero que se tiene que hacer antes de aislar los embriones es lavar el filtro con el medio para poder obtener embriones que se pudieran haber quedado adheridos en la pared de este o en la periferia del recipiente colector. Para localizar, identificar, aislar, manipular y clasificar embriones y óvulos sin fertilizar se requiere de considerable experiencia. Sin embargo; desde el momento en que los embriones son colectados deben ser manipulados con técnicas estériles y tan pronto como sea posible se deben colocar en el microscopio y lavar 3 veces en el mismo estéril, para

posteriormente, ser evaluados, almacenados, congelados o transferidos. Los embriones deben ser aspirados con una pipeta con un pequeño volumen de medio (menos de 2ml), para evitar la contaminación del medio fresco. Los embriones deben ser manejados con mucho cuidado para evitar causarles el mínimo daño.

5. Identificación de los embriones

Rivas, R. y Barceló, M. (2011), manifiestan que el embrión de bovino tiene un diámetro de aproximadamente 160 μm (0.16mm) hasta el día 8 de desarrollo. Por lo tanto, se requiere de un microscopio estereoscópico (aumento de 10 a 40 X) para identificar los embriones. La morfología de los embriones de bovino es similar después de la fertilización hasta el día 9 de desarrollo. La zona pelúcida se pierde del blastocisto entre el día 8 y 10. En este periodo existe un gran riesgo de dañarlo por el manejo, además de que son muy adhesivos y se pegan fácilmente a los tubos y a la cristalería.

La identificación de los embriones se basa en varias características morfológicas:

- La zona pelúcida es una estructura translúcida presente en todos los embriones hasta el día 9, se distingue fácilmente de otros desechos celulares y es utilizada como referencia.
- El color del embrión (ámbar oscuro) facilita la identificación por que usualmente es más oscuro que otros desechos celulares.
- El embrión es esférico y tiende a moverse en el fondo de la superficie del plato.
- El conocimiento del estadio del embrión facilita su identificación.

6. Estadios de desarrollo del embrión

Reyes, P. (2010), indica que los estadios de desarrollo del embrión se identifican, después de tener 16 células, de acuerdo al desarrollo morfológico. En resumen los estadios del embrión son los siguientes:

- Estado 1: Infertilizado.
- Estado 2: de 2 a 16 células
- Estado 3: Mórula temprana
- Estado 4: Mórula
- Estado 5: Blastocito temprano
- Estado 6: Blastocito
- Estado 7: Blastocito expandido
- Estado 8: Blastocito eclosionado
- Estado 9: Blastocito eclosionado en expansión

González, R. (2012), reporta que los estadios de los embriones presentan las siguientes características:

- Mórula: La masa embrionaria contiene 32 a 64 células. Las blastómeras son de forma redonda y no están estrechamente conectadas entre ellas.
- Mórula compacta: La forma de la mórula compacta es similar a la de una pelota de golf. En la membrana extrema es ligeramente abombada en su apariencia debido a la compactación. Las blastómeras individuales no son fáciles de distinguir.
- Blastocisto Temprano: Un fino y claro espacio es visible, el cual contiene fluido. Esta área es el inicio del blastocelo.
- Blastocisto: La cavidad ó blastocelo comprende más de 70% del embrión. Algunos grupos están presentes y son claramente reconocibles, como la capa trofoblástica, la zona pelúcida y la masa celular interna ocupando un lado del embrión. El espacio perivitelino es también visible.
- Blastocisto expandido: El blastocelo ocupa el mayor volumen del embrión. La capa trofoblástica está adosada a la membrana pelúcida eliminando completamente el espacio perivitelino. El disco embrionario se hace de fácil identificación y la membrana pelúcida reduce su espesor.

- Blastocisto eclosionado: Ha abandonado la membrana pelúcida y se caracteriza por ser una masa de células con variable compactación lo cual lo hace confundible con los detritus celulares presentes en el medio de lavado. El blastocisto eclosionado es más susceptible a la contaminación y a la manipulación. Es la categoría más difícil para la identificación.

7. Clasificación de los embriones

Reyes, P. (2010), sostiene que las evaluaciones de acuerdo a sus características morfológicas, son subjetivas y pueden variar de un técnico a otro. Las características que se deben tener en cuenta para calificar un embrión son:

- Forma del embrión
- Color y textura de la masa celular
- Diferencia de tamaño entre las blastómeras
- Número y nivel de compactación de las blastómeras
- Tamaño del espacio perivitelino
- Presencia de blastómeras sueltas o separadas
- Presencia o ausencia de vesículas
- Forma y estado de la zona pelúcida

En un estudio citado por Rivas, R. y Barceló, M. (2011), manifiesta que se comparó la calidad del embrión contra el porcentaje de preñez, y se observó que los embriones de excelente calidad presentaron un 63% de preñez, los de buena calidad 58%, los regulares 31% y los malos 12%.

E. MEDIOS PARA EL MANEJO Y MANTENIMIENTO DE EMBRIONES

González, R. (2012), indica que el fluido empleado para recolectar, almacenar o transferir embriones es denominado medio. Este medio debe sustituir al contenido del tracto reproductivo. Varios medios diferentes pueden ser usados para los embriones pero el más popular y conocido es el Fosfato-Buffer-Salino (PBS) o también llamado solución Dulbecco's (Cuadro 7). Otros medios de

cultivo celular como el Han's F10 y el TCM-199, son también utilizados para el mismo propósito.

Cuadro 7. SOLUCIÓN BUFFER – FOSFATO – SALINA (FORMULA PARA PREPARAR 10 LITROS).

Parte A		Parte C	
NaCl	80,0 g	Ca CL, 2H2O	1.325 g
KCL	2,0 g	MgSO4, 7H2O	1.312 g
Na2HPO4 7H2O	21,7 g	Disolver en 2 litros de agua des ionizada.	
KH2PO	2,0 g	Adicionar parte C a la solución A+B	
Glucosa	10,0 g		
Disolver 4 litros de agua destilada des ionizada			
PARTE B			
Dextrosa	10,0 g	Chequear pH y osmolaridad	
Na Piruvato	0,36 g	Filtrar (0,22 mm de porosidad)	
Na Penicilina G	1.000.000 UI		
Dihidroestreptomicina	1,0 g	Cambiar el filtro durante el procedimiento del filtrado	

Fuente: González, R. (2012).

1. Composición de los medios

a. Agua

En cualquier medio, el 95 a 99% de su composición es agua; es importante que esta sea relativamente pura, obtenida por destilación o desionización. El agua destilada no siempre resulta eficientemente adecuada por lo cual requiere de un subsiguiente tratamiento de purificación. El grado de pureza del agua es medido en función de la conductividad eléctrica siendo alrededor de 18 mhos. Las contaminaciones ordinarias del agua potable como lo son metales pesados

(plomo, cadmio y zinc) y los componentes orgánicos (pesticidas y toxinas) producidos por las bacterias y hongos y otros microorganismos, afectan a los embriones (González, R. 2012).

b. Cloruro de sodio

En los medios, la presencia del cloruro de sodio equilibra la presión osmótica en el interior celular. Una concentración alta o baja de cloruro de sodio ocasiona concentración o hinchazón de las células respectivamente. Los fosfatos por su efecto buffer mantienen el pH alto (>7,0) y poseen baja concentración de iones hidrógenos (González, R. 2012).

c. Fosfatos

Los fosfatos son adicionados en forma de fosfatos de sodio y fosfatos de potasio (González, R. 2012).

d. Potasio

Otro ingrediente es el potasio el cual está presente en elevada concentración dentro de la célula. Ayuda a mantener las propiedades eléctricas de la membrana celular; en caso de producirse crecimiento y multiplicación de las células, el potasio debe estar presente en el medio (González, R. 2012).

e. Calcio y magnesio

Otros dos componentes importantes son el calcio y el magnesio, ellos por su carga catiónica bivalente son necesarios para mantener la función enzimática celular (González, R. 2012).

f. Suplemento proteico

El suplemento proteico bajo la forma de albúmina, contiene átomos de oxígeno, nitrógeno y azufre. La más común fuente de albúmina es el suero bovino,

siendo denominado BSA (Bovino-Suero-Albúmina); algunos técnicos emplean simplemente BSA y otros, suero sanguíneo calentado (56° C por 30 min) para eliminar el efecto embriotóxico termolábil. Aún cuando las funciones del BSA son múltiples, la más importante es prevenir las adherencias de los embriones a la placa de petri u otros equipos. El medio sin la presencia de BSA, dificulta extremadamente el manejo de los embriones con la pipeta (González, R. 2012).

g. Antibióticos y antimicóticos

Otras sustancias necesarias son los antibióticos y antimicóticos pues previenen el crecimiento de microorganismos. Los antibióticos más comúnmente usados son Penicilina, Estreptomicina y Kanamicina en proporciones bajas de 100 UI/ml, 100 mcg/ml y 250 mcg/ml respectivamente. Como antimicótico se aplica Anfotericina-B en concentración de 0,25 mcg/ml. A pesar de que los medios son sometidos a esterilización por filtración (poros 0,22 μ m), es imposible prevenir las contaminaciones durante los procedimientos rutinarios de transplantes de embriones (González, R. 2012).

h. Ingredientes opcionales

Los ingredientes opcionales son la glucosa y el piruvato de sodio, cuya función es servir de fuente energética. Si los embriones permanecen menos de 12 horas fuera del ambiente uterino, estas sustancias energéticas son poco necesarias ya que las células del embrión han almacenado sustancias de esta naturaleza. Si los embriones van a permanecer tanto tiempo como 24 horas, deberían proporcionarse al medio moléculas energéticas para lograr mejores resultados. El medio PBS, es un medio simple que cumple con los requisitos necesarios en la tecnología del transplante y su sencilla formulación lo hace un medio muy económico y de fácil preparación (González, R. 2012).

F. CONSERVACIÓN DE EMBRIONES

La posibilidad de conservación de embriones facilita la difusión de material de

alto valor genético a nivel local o regional.

1. Conservación por enfriamiento a 5 °C

Para un transporte a corta distancia, la refrigeración a 5 °C permite su conservación por 24 horas, en medio de cultivo (Ovum Culture Medium). La velocidad de enfriamiento se realiza a razón de 1 °C por minuto. Para su utilización, el calentamiento de los embriones se realiza a 0.6 °C por minuto o bien se colocan directamente a 37 °C en PBS enriquecido. Se examinan a la lupa, se seleccionan y se siembran inmediatamente. El porcentaje de sobrevivencia varía entre el 35 al 48% (Gibbons, A. y Cueto, M. 2010).

2. Conservación por congelamiento en nitrógeno líquido

Gibbons, A. y Cueto, M. (2010), señalan que el congelamiento de los embriones y mantenerlos en nitrógeno líquido por períodos prolongados, ha permitido la comercialización internacional y por ende la difusión a nivel mundial del material genético. El procedimiento consiste en someter las células embrionarias a la incorporación de medios crioprotectores. Estos compuestos (polialcoholes) son capaces de penetrar en las células por difusión simple y su función es disminuir la formación de los cristales de agua por medio del descenso del punto de congelación. El medio que contiene los embriones (extracelular) es más rico en agua que el medio intracelular. Por lo tanto, al comienzo del congelamiento, la formación de los primeros cristales de hielo se produce en el medio extracelular, generando la salida de agua intracelular hacia el exterior, por difusión, y disminuyendo la formación de hielo intracelular. Los tiempos y la velocidad del proceso de congelamiento determinan la futura viabilidad del embrión.

La congelación se realiza con embriones de calidad excelente o muy buena, en estado de mórula compacta o blastocisto expandido (día 6to o 7mo post estro). El estadio de blastocisto es más resistente al congelamiento, debido a que una parte de las células puede sufrir severos daños, pero sin que se limite su futuro desarrollo.

La selección de los embriones antes de su congelamiento es de vital importancia, debido a que su estado determina sus posibilidades de sobrevivir a la descongelación. Los blastocistos sin membrana pelúcida pueden ser congelados sin afectarse su sobrevivencia. Las limitantes en este caso son de tipo sanitario.

3. Técnica de congelamiento

Gibbons, A. y Cueto, M. (2010), indican que una vez recuperados los embriones, se seleccionan y colocan en baños sucesivos de 10 minutos en soluciones crecientes de etilenglicol (0.5 M, 1 M, 1.5 M) en PBS con 20% de suero fetal bovino a temperatura ambiente. Durante este período se produce encogimiento celular por pérdida de agua y lenta reexpansión por ingreso del crioprotector. Finalizada esta etapa, se colocarán en pajuelas de 0.25 cc. Es importante rotular las pajuelas, indicando la hembra donante, raza, número de embriones y fecha. Los embriones se acondicionarán en la pajuela con la solución de 1.5 M etilenglicol en PBS, separados hacia ambos extremos por un espacio de aire y una columna de PBS + suero. A continuación, se sella la pajuela con alcohol polivinílico.

El tiempo entre colecta e inicio del congelamiento no debe superar los 40 minutos. El descenso de temperatura se realiza a razón de 1 a 3 °C por minuto hasta -7 °C. A los 30 segundos de permanencia en esta temperatura, se procede a realizar el seeding (inducción a la cristalización). El seeding se realiza con una pinza enfriada en nitrógeno líquido, mediante contacto de 2 a 3 segundos sobre cada uno de los bordes de la fracción de aire situada por encima de la columna que contiene los embriones. Su función es inducir la formación temprana de cristales de hielo, de tal manera que la tasa de enfriamiento es menor, las células disponen de más tiempo para deshidratarse y se minimiza el daño celular.

Posteriormente, la temperatura se mantiene a -7 °C durante 10 minutos (tiempo de equilibramiento), al término de los cuales, se continúa el descenso térmico a razón de 0.3 °C por minuto hasta -35 °C. El tiempo de estabilización a -35 °C

es de 15 minutos. Luego, las pajuelas se transfieren al termo de nitrógeno líquido y se sumergen en este medio a -196 °C.

4. Técnica de descongelamiento

De acuerdo a Gibbons, A. y Cueto, M. (2010), el descongelamiento de los embriones se realiza en baño termostático de agua a 37 °C durante 30 segundos. Posteriormente, se realiza la extracción progresiva del crioprotector en etapas sucesivas (5 a 10 minutos cada una), sumergiendo los embriones en placas de Petri con concentraciones decrecientes de etilenglicol (1 M, 0.5 M) en base a PBS + suero 20%, y luego se los coloca en una placa con PBS + suero. Seguidamente se realiza una evaluación de las características morfológicas. En este examen se lleva a cabo una selección de los embriones debido a los daños que se presentan por el proceso de congelamiento/descongelamiento. Como valor de referencia, se acepta entre un 10 y un 30% de embriones dañados.

Otra técnica de remoción del crioprotector al descongelamiento, consiste en el empleo de sucrosa. Esta sustancia, debido a su alto peso molecular, no puede pasar al interior de los embriones y genera, por lo tanto, un medio hiperosmótico extracelular que ejerce una función de difusión masiva del crioprotector hacia el exterior de los embriones. Asimismo produce retención de agua en el medio extracelular impidiendo que ésta ingrese a mayor velocidad que la salida del crioprotector. En la práctica, los embriones descongelados se colocan en una solución de sucrosa 0.25-0.5 M en PBS + suero durante 5 a 10 minutos, y luego se realizan 3 pasajes sucesivos de 5 a 10 minutos en PBS + suero.

Se recomienda que ante la compra de embriones se solicite al laboratorio que realizó el congelamiento de embriones, el envío del protocolo de congelamiento y de descongelamiento y el certificado sanitario correspondiente.

5. Técnica de vitrificación

Gibbons, A. y Cueto, M. (2010), señalan que otra técnica de conservación a bajas temperaturas es la vitrificación. El principio físico se basa en someter a los embriones a una alta concentración de crioprotector en muy bajos volúmenes de solución, de manera de evitar la formación de cristales de hielo. El procedimiento para la vitrificación se realiza a temperatura de laboratorio (25 °C), en tres pasos sucesivos de inmersión de los embriones en soluciones crecientes de glicerol y etilenglicol, en base de PBS con 20% de suero fetal bovino; de la siguiente manera:

- Los embriones son colocados durante 5 minutos en una solución de glicerol 12.5% + etilenglicol 12.5% + sucrosa 0.5 M en base de PBS con 20% de suero fetal bovino.
- Posteriormente se colocan a temperatura ambiente en dos soluciones de 0.5 M y 0.25 M de sucrosa (5 minutos por solución).
- Por último, los embriones son lavados 2 veces en PBS + suero (2.5 minutos por solución).

6. Consideraciones en la clasificación de embriones descongelados

Rivas, R. y Barceló, M. (2011), señalan que para clasificar a los embriones descongelados se deben tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- El color de los embriones descongelados usualmente es más oscuro que los no congelados debido a un incremento de células muertas.
- El embrión descongelado es usualmente más pequeño, especialmente la cavidad blastocélica.
- Puede haber daño extensivo en la zona pelúcida como cuarteaduras, desgaste o pérdida de la zona pelúcida.

- Se puede perder la viabilidad si una gran porción del embrión es material extruido.
- El número de inclusiones vesiculares grandes indica la extensión del daño al esqueleto citoplasmático; ésta probablemente indica destrucción masiva de organelos.
- El grado en el que el embrión llena la cavidad de la zona pelúcida es indicativo de calidad embrionaria. Demasiada deshidratación del embrión causa demasiado encogimiento, causando daño mecánico.
- Si las células están todavía compactas, la calidad es mejor que si estuvieran sueltas, ya que se destruyen las uniones de célula a célula, disminuyendo la probabilidad de preñez.
- Si la apariencia del embrión es favorable comparada con la apariencia antes del congelamiento, las oportunidades de preñez se mejoran.
- Las cuarteaduras de la zona pelúcida no necesariamente significan que los embriones están dañados.

G. RECEPTORAS QUE PUEDEN SER ÚTILES PARA RECIBIR UN EMBRIÓN

Orellana, J. y Peralta, E. (2007), establecen que la selección de receptoras requiere de varios aspectos y procedimientos a considerar para el buen desempeño en la T.E. La selección de la receptora desde el punto de vista genético no tiene mayor consecuencia en la T.E.; aunque no se debe descartar el efecto que tiene la habilidad materna (como carácter genético), las óptimas condiciones de clima, el buen manejo y la excelente alimentación sobre la implantación y el desarrollo de los embriones transferidos.

Por tanto concluye que toda vaquilla sexualmente adulta y sin patologías reproductivas, así como toda vaca sana y sin trastornos ginecológicos puede ser tomada como una receptora. Entiéndase por patologías reproductivas, la

aciclia, ninfomanía y endometritis; y por anomalías ginecológicas a los órganos sexuales femeninos y hermafroditismo.

Las receptoras deben ser cruza de razas lecheras y razas cebuínas, ya que las vacas receptoras cruzadas son animales más fértiles, presentan una mayor habilidad materna para la crianza de los terneros y también se adaptan mejor a condiciones adversas del medio.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

A. LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO

La presente investigación se realizó en diferentes explotaciones lecheras de la sierra centro del país. Las condiciones meteorológicas imperantes en la zona se detallan en el Cuadro 8.

Cuadro 8. CONDICIONES METEOROLÓGICAS DE LA ZONA DE INFLUENCIA DEL ESTUDIO.

Parámetro	Chambo ^a	Chunchi ^b	Mejía ^c
Temperatura, °C	14.5	12	12
Humedad relativa, %	70.0	73.8	75
Precipitación, mm/año	650.8	720	535.2
Heliofanía, Horas luz/año	159.7	155	160

Fuente:

a: Estación Agro meteorológica cantón Chambo, provincia de Chimborazo (2012).

b: Estación Agro meteorológica cantón Chunchi, provincia de Chimborazo (2012)

c: Cantón Mejía, provincia de Pichincha, El CLIRSEN (2012)

El trabajo experimental tuvo una duración de 60 días, durante los cuales se realizó la sincronización e inducción de la superovulación, la inseminación a tiempo fijo (IATF), y posteriormente se recolectó y evaluó la calidad de los embriones para proceder a su conservación.

B. UNIDADES EXPERIMENTALES

En el trabajo se utilizaron 24 vacas lecheras, distribuidas en dos tratamientos

experimentales (12 en cada uno), tomando en cuenta como factor de selección que por lo menos haya tenido un parto normal, que sean fértiles y que tengan una producción de leche alta. El tamaño de la unidad experimental fue de un animal.

De las vacas utilizadas, el 54.17 % fueron de la raza Brown swiss (13 animales), el 25.00 % de la raza Holstein Friesian (6 animales) y el 20.83 % de la raza Jersey (5 animales).

C. MATERIALES Y EQUIPOS

Los materiales, equipos e instalaciones que se utilizaron en el desarrollo de la presente investigación fueron:

1. Instalaciones

- Corrales de manejo
- Manga para el lavado de embriones
- Laboratorio.
- Laboratorio móvil de transferencia de embriones

2. Animales

- 12 vacas como donadoras de diferentes razas

3. Hormonas y fármacos

- Benzoato de Estradiol ®
- GnRH (Gonaxal ®)
- Folículo estimulante (Foltropin ®)
- Prostaglandina (Lutalyse ®)
- 12 Dispositivos intravaginales bovinos (DIB ®)
- Lidocaína al 2%
- Xilocaina (Dormixil ®)

4. Materiales de inseminación artificial

- Termo de Nitrógeno
- Pajuela de toros de diferentes razas.
- Catéteres de inseminación.
- Pistola de inseminación
- Guantes plásticos de IA.
- Pinza.
- Corta pajuelas.
- Papel de secado.
- Chemis (funda protectora del catéter)

5. Materiales y equipos para el lavado de embriones

- Guantes largos de palpar.
- Guantes de látex
- Medio de lavado
- Catéteres de lavados de embriones.
- Tubo "Y" para colecta de embriones.
- Filtros de Embriones
- Envase para recuperar embriones
- Papel higiénico sin olor.
- Jeringas de 1, 5, 10 y 50 ml.
- Aguja de 18x11/2.

6. Materiales y equipos para la búsqueda y congelación de los embriones

- Congelador con sistema de enfriamiento controlado.
- Nitrógeno líquido.
- Medios de congelación
- Pajuelas irradiadas
- Tapones de las pajuelas
- Cajas Petri

- Termo con Nitrógeno líquido.
- Estereoscopio.
- Marcador para etiquetar las pajuelas.
- Jeringas de insulina
- Jeringas de 5 ml
- Filtro de jeringas
- Pipetas pequeñas
- Pinzas hemostáticas largas con puntas rectas de 5,5"
- Cronómetro
- Registro de recuperación, transferencia y congelación de embriones.
- Registro de las donadoras que participaron en el lavado.

7. Materiales de limpieza y desinfección

- Desinfectante (amonio cuaternario)
- Detergente
- Agua limpia.
- Escoba
- Trapeador
- Toallas
- Jabón

8. Otros materiales

- Overol.
- Botas de caucho.
- Gafas de protección.
- Gorra
- Mascarillas.
- Sogas
- Recipientes para el agua
- Basureros.

D. TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Se evaluó el efecto de la superovulación en vacas lecheras de diferentes razas en base a implantes de dispositivos intravaginales de P4 (DIB) + EB más la aplicación o no de GnRH durante la 1ª Inseminación artificial, por lo que se contó con dos tratamientos experimentales y cada uno con 12 repeticiones, por lo que las unidades experimentales fueron distribuidas bajo un diseño de completamente al azar (DCA).

El esquema del experimento empleado se reporta en el Cuadro 9.

Cuadro 9. ESQUEMA DEL EXPERIMENTO.

Dispositivo hormonal	Código	Repeticiones	T.U.E.	Nº vacas/tratamiento
DIB sin GnRH en la 1ª I.A.	T1	12	1	12
DIB + GnRH en la 1ª I.A.	T2	12	1	12
Total vacas				24

T.U.E.: Tamaño de la Unidad experimental, una vaca.

E. MEDICIONES EXPERIMENTALES

Las variables experimentales que se evaluaron fueron las siguientes:

- Raza de las vacas, Nº y %.
- Edad de las vacas, años
- Peso de los animales, kg
- Condición corporal, 5 puntos
- Embriones recolectados por animal, Nº
- Cantidad de embriones no viables, %
- Cantidad de embriones viables, %
- Costo por embrión viable para conservación, dólares

F. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados experimentales fueron sometidos a las siguientes pruebas

estadísticas:

- Medidas de tendencia central (medias) y de dispersión (desviación estándar), para expresar los datos obtenidos de la raza, edad y condición corporal de las vacas, así como en la cantidad y calidad de embriones obtenidos por animal
- Prueba Chi cuadrado (X^2), para establecer si existen o no diferencias significativas por efectos de los tratamientos en las respuestas de la superovulación, y porcentaje de embriones viables recolectados.
- Prueba de t'studen considerándose varianzas desiguales, para comparar el efecto de los tratamientos en el número de estructuras y embriones recolectados, así como para la cantidad de los embriones viables.

G. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. De campo

Al inicio de la investigación se realizó una selección de los animales en base a los registros productivos y reproductivos existentes, también fueron sometidas a un chequeo ginecológico para determinar el estado fisiológico de los ovarios. Luego se escogieron a las vacas que reunían las siguientes particularidades:

- Que estén libres de enfermedades y que tengan al menos un parto.
- Que no presenten anomalías, ni enfermedades en el tracto genital.
- Que presenten estructuras indicadoras de funcionalidad ovárica (cuerpo lúteo, folículos)
- Que sean buenas productoras de leche.

a. Aplicación de los tratamientos hormonales

De las vacas que reunieron las características anteriormente mencionadas se asignaron aleatoriamente la aplicación de los tratamientos hormonales, de la manera que se reporta en el Cuadro 10.

b. Inseminación artificial

Para la inseminación artificial se utilizó material seminal de toros de diferentes casas comerciales, para lo cual se procedió a preparar la pajuela, y luego de localizar el cuello del útero por medio de palpación rectal, se procedió a introducir el catéter y descargar el semen en el primer tercio del cuerpo del útero, con la ayuda del equipo de inseminación artificial para bovinos.

Cuadro 10. PROTOCOLOS UTILIZADOS PARA LA SUPEROVULACION.

Día		Tratamiento 1	Tratamiento 2
0		Inserción del dispositivo con P4 + 1 ml (1mg) EB	Inserción del dispositivo con P4 + 1 (1mg) ml EB
Día 4	AM	2.5 ml (50mg) de FSH (Foltropin)	2.5 ml (50mg) de FSH (Foltropin)
	PM	2.5 ml (50mg) de FSH (Foltropin)	2.5 ml (50mg) de FSH (Foltropin)
Día 5	AM	2.5 ml (50mg) de FSH (Foltropin)	2.5 ml (50mg) de FSH (Foltropin)
	PM	2.5 ml (50mg) de FSH (Foltropin)	2.5 ml (50mg) de FSH (Foltropin)
Día 6	AM	2.5 ml (50mg) FSH + 5 ml (25mg) PGF2 α (Lutalyse)	2.5 ml (50mg) FSH + 5 ml (25mg) PGF2 α (Lutalyse)
	PM	2.5 ml (50mg) FSH + 5 ml (25mg) PGF2 α (Lutalyse)	2.5 ml (50mg) FSH + 5 ml (25mg) PGF2 α (Lutalyse)
Día 7	AM	Retiro del dispositivo 2.5 ml (50mg) de FSH (Foltropin)	Retiro del dispositivo 2.5 ml (50mg) de FSH (Foltropin)
	PM	2.5 ml (50mg) de FSH (Foltropin)	2.5 ml (50mg) de FSH (Foltropin)
Día 8	AM	I.A.	I.A. + 2.5 ml GnRH (0.011mg) (Gonaxal)
	PM	I.A.	I.A.
Día 9	AM	I.A.	I.A.
Día 15	AM	Recolección de embriones	Recolección de embriones

Fuente: Andino, P. (2012).

c. Recolección de los embriones

El proceso de recolección de los embriones se realizó mediante la técnica no quirúrgica y que comprende de un lavado del útero con una solución salina adicionada albúmina sérica y antibióticos de la siguiente manera:

Primeramente se aplicó anestesia epidural en la base de la cola para evitar las contracciones del recto y que permita la manipulación del útero durante los 15 a 20 minutos que dura el lavado.

El lavado se consigue introduciendo el catéter de Foley a través del cérvix hasta la curvatura mayor del cuerno, lugar donde se fija inflando el globo del catéter, el cual se une a la manguera tygon. Por un lado de la bifurcación entra el medio al útero, cada vez que se llena éste se le da un masaje, posteriormente se extrae el medio el cual sale hacia el filtro colector de embriones. Una vez lavado un cuerno, se saca el catéter y se repite la operación en el cuerno opuesto. El momento indicado para realizar la colección es entre el día 6.5 a 7 de iniciado el estro, debido al tipo de estructuras que se encuentran en estos días considerando de que los embriones pasan del oviducto al cuerno uterino en el cuarto o quinto día. Después de la colección embrionaria las donadoras reciben una inyección de prostaglandinas F2 α (25 mg de Dinoprost trometamina), con el objeto de inducir la regresión de los cuerpos lúteos y evitar una posible gestación, incluso múltiples gestaciones.

d. Localización

Los embriones son microscópicos, por lo cual se necesita localizarles en el laboratorio con la ayuda de un microscopio estereoscópico.

- Una vez terminado el lavado, el filtro se vacía en un recipiente de plástico y se enjuaga con solución a presión. El recipiente se revisa a 15 aumentos (15 X) y al localizar cada embrión se debe ir pasando con una pipeta a otro recipiente más pequeño que contenga la misma solución con más albúmina.

- Esta transferencia se debe hacer solo a aquellos embriones que están en un estado de desarrollo de mórula o blástula, que es lo normal a los 7 días después de la fecundación.
- Los óvulos que no fueron fecundados y los embriones de escaso desarrollo deben ser desechados.

e. Conservación

Para mantener viables a los embriones durante períodos prolongados (años), se requiere añadir 10% de glicerol a la solución salina para que proteja al embrión durante el proceso de congelación, para lo cual, al embrión se le colocó en una pajilla previamente identificada con los datos de la donadora y del embrión, y con la ayuda de un congelador se enfrió lentamente hasta -7°C , con lo que se provoca que empiece a formarse hielo en la solución, luego se enfría más lentamente hasta -35°C ; finalmente se pasan las pajillas al termo de conservación a -192 grados centígrados.

2. Programa sanitario

Con relación al manejo sanitario, las vacas previas a la aplicación de los tratamientos hormonales fueron inmunizadas según el calendario sanitario de cada localidad, también se realizó una desparasitación interna, en tanto que la desparasitación externa se realizó mediante baños de aspersión.

H. METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN

1. Edad de las vacas, años

Se calculó utilizando los registros reproductivos de los animales, tomando en consideración la fecha de nacimiento con la fecha en la que se aplicó los tratamientos, siendo expresada en años.

2. Pesos, kg

El registro de los pesos, se realizó por medio de la cinta bovinométrica, con la cual se midió el perímetro torácico y esta medida se transformó a su equivalencia en Kg.

3. Condición corporal, puntos

La condición corporal se estimó mediante el enunciado de Fertig, M. y Luchetti, D. (2005), quienes establecen una escala que va de 1 a 5 puntos, siendo 1 el valor correspondiente a una vaca extremadamente delgada y 5 el correspondiente a una vaca extremadamente gorda.

4. Embriones recolectados por animal, N°

La cantidad de embriones recolectados se estableció a través del conteo directo de todos los embriones obtenidos por vaca.

5. Cantidad de embriones viables, %

La cantidad de embriones viables están representados por su grado de desarrollo y calidad, teniendo como base un número progresivo para los diferentes estadios de desarrollo y para la calidad del embrión.

Cuadro 11. CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN PARA EMBRIONES BOVINOS.

Grado de desarrollo	Clave	Edad del embrión	No. de células
Óvulo	1		
2 a 16 blastómeros	2	2 -4 días	2-16
Mórula temprana	3	5 días	> 16
Mórula compacta	4	6 días	32-64
Blastocito temprano	5	7 días	160
Blastocito maduro	6	7 días	180
Blastocito expandido	7	8 días	200
Blastocito en eclosión	8	9 días	>200
Embrión eclosionado	9		

Fuente: González, R. (2012).

6. Costo por embrión viable para conservación, dólares

Los costos por embrión viable se determinaron en función de los egresos que se realicen, tomando en cuenta las aplicaciones de los dispositivos intravaginales, las hormonas, la inseminación artificial, los materiales e insumos utilizados en la recolección, localización y conservación, y dividirlos para el número de embriones viables.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANIMALES

La distribución de los animales que intervinieron en la investigación caracterizados de acuerdo a la raza, edad, peso y condición corporal se resume en el Cuadro 12 y que se describen a continuación:

Cuadro 12. CARACTERÍSTICAS DE LAS VACAS LECHERAS A SER SOMETIDAS A DOS PROGRAMAS DE SUPEROVULACIÓN PARA LA OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE EMBRIONES.

Raza	Nº obs.	Edad, años		Peso, kg		CC (5 puntos)	
		Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
Brown swiss	13	7,54	± 3,31	495,54	± 41,42	3,56	± 0,33
Holstein Friesian	6	6,50	± 1,64	560,67	± 41,37	3,33	± 0,20
Jersey	5	9,00	± 4,00	378,60	± 21,44	3,25	± 0,18
Promedio		7,68		478,27		3,38	
Desv. Estándar		1,26		92,26		0,16	

Nº obs.: Número de observaciones.

D.E.: Desviación estándar.

CC: Condición corporal.

Fuente: Andino, P. (2013).

1. De acuerdo a la raza

De las 24 vacas que formaron parte de la investigación, distribuidas de acuerdo a la raza, se estableció que el 54.17 % (13 animales) corresponden a la raza Brown swiss, el 25 % (6 vacas) a la raza Holstein Friesian y el 20 % (5 vacas) de la raza Jersey (Gráfico 1), que son los grupos genéticos más representativos de las explotaciones lecheras de la región central del Ecuador, debiendo tenerse en cuenta que se seleccionaron estos animales dentro de las diferentes explotaciones por sus altos niveles de producción y sus antecedentes reproductivos, lo que confirma lo señalado por De la Fuente, J. (2004), quien indica que normalmente se acostumbra a formar un grupo de donantes de élite que contenga aproximadamente entre el 1 al 5 % de los animales presentes en el rebaño, para asegurar un progreso genético adecuado, además de que cuando mayor sea la variabilidad genética de la población de animales, más interesante resultará la utilización de la transferencia de embriones.

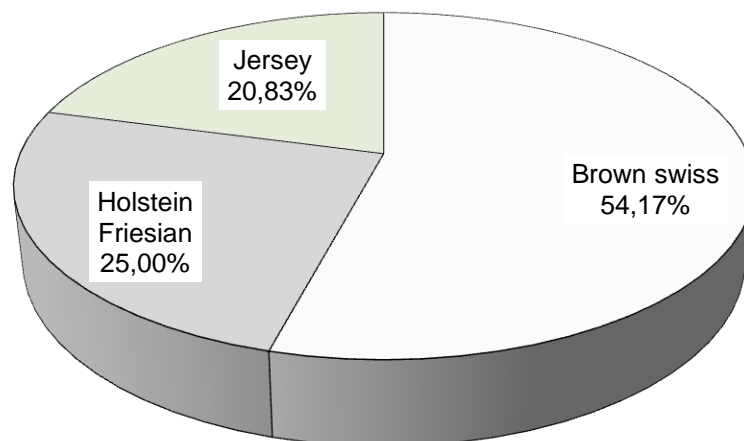


Gráfico 1. Distribución de las vacas que fueron sometidas a dos programas de superovulación, de acuerdo al grupo genético.

2. De acuerdo a la edad

Las vacas en estudio presentaron una edad promedio de 7.68 ± 1.26 años, por cuanto según el grupo genético las vacas Brown swiss tuvieron 7.54 ± 3.31 años, las vacas Holstein Friesian 6.50 ± 1.64 años y las vacas Jersey 9.00 ± 4.00 años (Gráfico 2), considerándose que la edad de las vacas pueden influir en las respuestas de los tratamientos de la superovulación, por cuanto Becaluba, F. (2007), señala que el efecto que tiene la edad de la donante sobre la respuesta superovulatoria ha sido muy estudiado en ganado lechero, obteniendo un número mayor de embriones transferibles en las donantes de 3 a 6 años que en las vaquillonas y las vacas mayores de 10 años, ya que además Peña, A. et al. (2001), en cuanto a selección de hembras donantes de embriones indican que la edad de las donadoras debe encontrarse entre 3 y 10 años; sin embargo, Moreno, D. (2004), reporta que las vacas donadoras responden con mayor facilidad a los tratamientos de superovulación cuando están jóvenes, al igual De la Fuente, J. (2004), manifiesta que en el ganado lechero hasta los 7 a 8 años, la respuesta a la superovulación entra dentro de los parámetros normales, pero a partir de esta edad se inicia un descenso tanto en el porcentaje de vacas que responden al tratamiento, como en el número y porcentaje de embriones viables obtenidos, comportamiento que es ratificado por Hanselmann, D. (1995), quien efectuó un estudio retrospectivo en el que analizó la respuesta superovulatoria de 197 donantes, agrupándolas en tres

categorías, hasta 5 años, de 6 a 8 años y mayores de 8 años; en donde el promedio mayor obtuvo en las hembras que oscilaban entre los 6 a 8 años de edad; por consiguiente la edad de los animales estudiados están dentro de los parámetros normales para ser consideradas como donadoras normales.

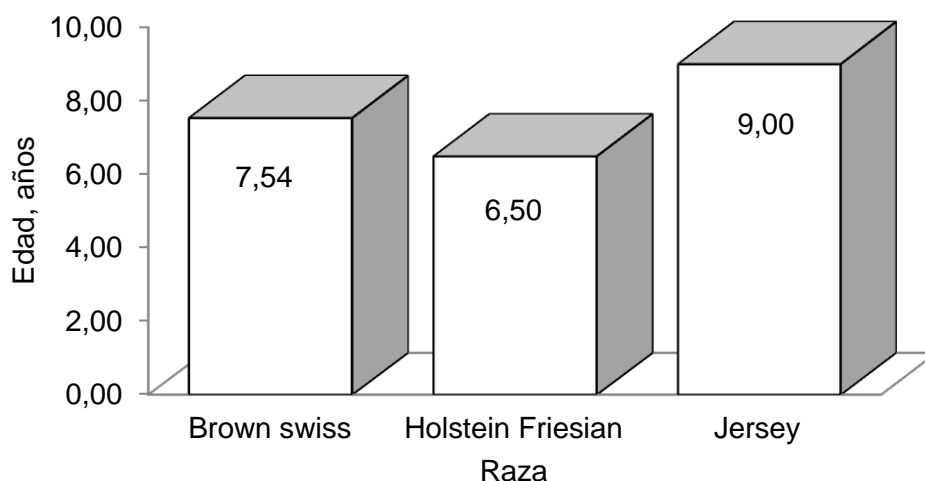


Gráfico 2. Edad de las vacas que fueron sometidas a dos programas de superovulación, de acuerdo al grupo genético.

3. De acuerdo al peso

Los pesos de las vacas en estudio dependieron de las características del grupo genético correspondiente, por cuanto Peña, A. et al. (2001), indica que las razas lecheras tienen características distintivas que permiten su identificación. La Holstein-Friesian es la de mayor tamaño; le sigue en tamaño la Brown Swiss y la Jersey es la raza más pequeña, por consiguiente los pesos establecidos estuvieron en función de lo enunciado, es decir, las vacas Holstein Friesian tenían un peso de 560.67 ± 41.37 kg, las vacas Brown swiss 495.54 ± 41.42 kg y las vacas Jersey con 378.60 ± 21.44 kg (Gráfico 3), por lo que el peso promedio fue de 478.27 ± 92.26 kg, en función de estos pesos registrados, es necesario tener en cuenta lo que señala Fraure, R. (2004), quien indica que cada vaca tiene un rango de pesos óptimos para lograr una concepción exitosa, por debajo de estos pesos la capacidad reproductiva disminuye, y por encima, el animal tiende a ser infértil. En tal sentido, todos los trabajos realizados coinciden en que el crecimiento excesivo se traduce con posterioridad en una

mayor dificultad para concebir y en un acortamiento de la vida productiva del animal, el engorde excesivo obstruye el desarrollo folicular por infiltración de grasa.

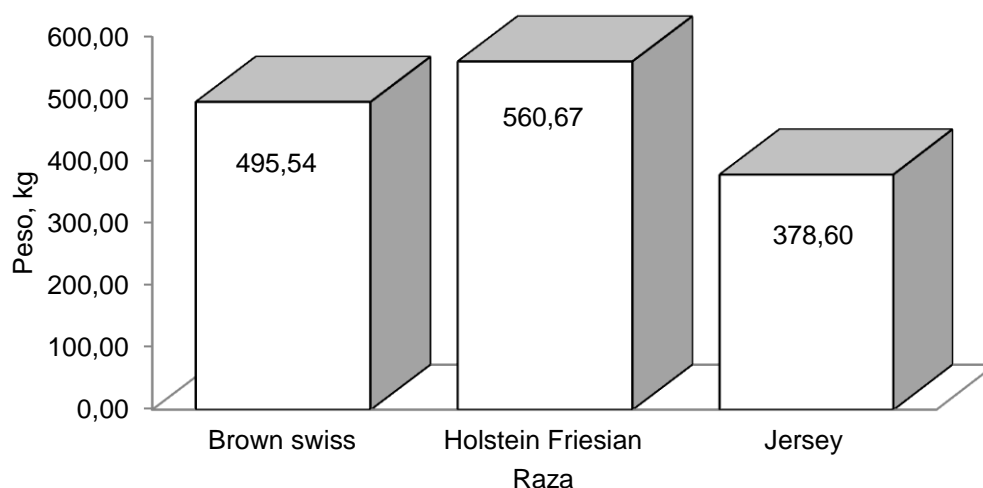


Gráfico 3. Peso de las vacas que fueron sometidas a dos programas de superovulación, de acuerdo al grupo genético.

4. Condición corporal

Los valores de la condición corporal de las vacas en estudio, asignados en base a la escala de valoración propuesta por Fertig, M. y Luchetti, D. (2005), que es entre 1 y 5, correspondiéndole el valor de 1 a una vaca extremadamente delgada y 5 a una vaca extremadamente gorda, se determinó que las vacas Brown swiss presentaban una condición corporal de 3.56 ± 0.33 , en las Holstein Friesian de 3.33 ± 0.20 y en las Jersey de 3.25 ± 0.18 (Gráfico 4), con un promedio general de 3.38 ± 0.16 , por consiguiente se establece que todos los animales utilizados como donadoras, presentaron una condición corporal adecuada, ya que Peña, A. et al. (2001), exponen que la donadora debe estar en una condición corporal entre 3,0 y 4,0 sobre un valor máximo de 5,0. Por cuanto la condición corporal influye en las tasas de ovulación, fecundación y viabilidad de los embriones.

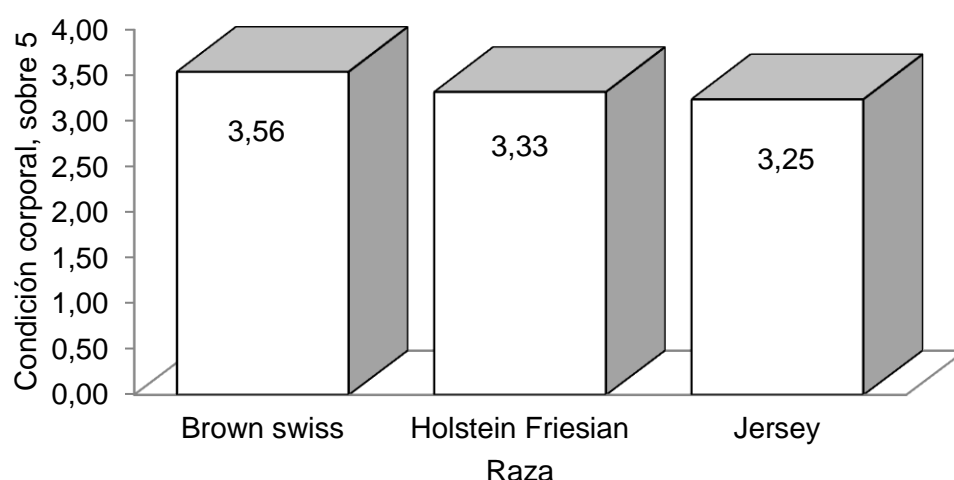


Gráfico 4. Condición corporal de las vacas que fueron sometidas a dos programas de superovulación, de acuerdo al grupo genético.

B. EFECTO DE LOS PROTOCOLOS DE LA SUPEROVULACION

1. De acuerdo a los tratamientos

Al evaluar el efecto de la superovulación en vacas lecheras de diferentes razas en base a implantes de dispositivos intravaginales de P4 (DIB) + EB más la aplicación o no de GnRH durante la 1ª Inseminación artificial, se encontró los resultados que se reportan en Cuadro 13.

Cuadro 13. EFECTO DE DOS PROGRAMAS DE SUPEROVULACIÓN EN VACAS LECHERAS DE DIFERENTES RAZAS.

	Superovuladas		No ovuladas		Total		X ² cal	X ² tab
	Nº	%	Nº	%	Nº	%		
Tratamientos							0,38	3,84
T1	10	83,33	2	16,67	12	100		
T2	11	91,67	1	8,33	12	100		

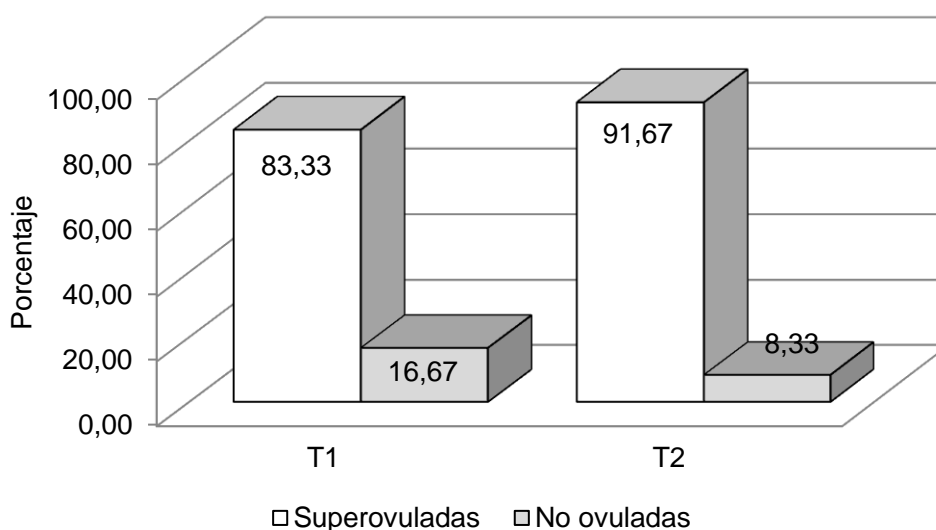
T1: Dispositivos intravaginales de P4 (DIB) + EB sin GnRH en la 1ª I.A.

T2: Dispositivos intravaginales de P4 (DIB) + EB + GnRH en la 1ª I.A.

X²cal < X² tab: No existen diferencias estadísticas.

Fuente: Andino, P. (2013).

Estadísticamente las respuestas de superovulación de las vacas por efecto de los tratamientos empleados no difieren estadísticamente según la prueba de Chi cuadrado ($X^2_{cal} < X^2_{tab}$), sin embargo numéricamente se encontró una mayor proporción de vacas que superovularon con la aplicación de la GnRH durante la 1ª Inseminación, que corresponden al 91.67 % de las vacas (11 de 12 animales evaluados), en cambio que al no aplicarse la GnRH durante la 1ª Inseminación, el porcentaje de vacas que superovularon fue menor y que corresponde al 83.33 % de las vacas tratadas (10 de 12 animales evaluados, Gráfico 5), lo que puede deberse a que cuando se aplica la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH), ésta es receptada por la hipófisis o pituitaria anterior para que produzca la liberación de FSH y LH al torrente sanguíneo. La GnRH tiene un efecto directo sobre la oleada preovulatoria que se inicia por los altos niveles de estrógenos procedentes del folículo que se está madurando, lo que provoca que exista un desprendimiento de un mayor número de óvulos para que sean fertilizados (Illera, M. 1994).



T1: Dispositivos intravaginales de P4 (DIB) + EB sin GnRH en la 1ª I.A.
T2: Dispositivos intravaginales de P4 (DIB) + EB + GnRH en la 1ª I.A.

Gráfico 5. Efecto de dos programas de superovulación, en vacas lecheras de diferentes razas.

Los resultados encontrados concuerdan con los señalado por De la Fuente, J. (2004), quien indica que los mayores riesgos en la transferencia de embriones han de asumirse en el apartado de la superovulación ya que entre el 20 y 25%

de los animales no responde a los tratamientos estimulatorios y aquellos que lo hacen presentan una gran variabilidad en las respuestas superovulatorias de las hembras donantes, que entre otros factores viene condicionada por el estado general, historial clínico del animal, el momento de la superovulación, la dosis y tipo de hormona estimulante utilizada, así como del número de superovulaciones consecutivas realizada y el grupo genético.

2. De acuerdo a la raza

Tomando en cuenta la raza como factor que interviene en las respuestas de la superovulación (Cuadro 14, Gráfico 6), se encontró que entre los resultados alcanzados existen diferencias altamente significativas ($X^2_{cal} > X^2_{tab}$), por cuanto de las 13 vacas Brown swiss evaluadas todas presentaron superovulación, no así en las otras razas consideradas, como en las vacas Jersey que de 5 animales el 80 % de estas (4 vacas) presentaron superovulaciones y en las Holstein Friesian de 6 animales tratados el 66.67 % (4 vacas), presentaron respuestas positivas a los tratamientos hormonales, respuestas que ratifican lo encontrado por Palma, G. (2001), quien señala que en un estudio sobre tratamientos de superovulación efectuados en donantes de 13 razas distintas, encontró que la raza de las donantes es un factor de variación en aspectos tales como: número de superovulaciones, número de ovocitos y embriones recolectados, número de embriones transferibles, número de preñeces y porcentaje de preñez.

Cuadro 14. RESPUESTAS DE SUPEROVULACIÓN EN VACAS LECHERAS DE DIFERENTES RAZAS CON DIFERENTES TRATAMIENTOS HORMONALES.

	Superovuladas		No ovuladas		Total		X ² cal	X ² tab
	Nº	%	Nº	%	Nº	%		
Raza							38,51	5,99
Brown swiss	13	100,00	0	0,00	13	100		
Holstein Friesian	4	66,67	2	33,33	6	100		
Jersey	4	80,00	1	20,00	5	100		

X²cal < X² tab: Existen diferencias estadísticas.

Fuente: Andino, P. (2013).

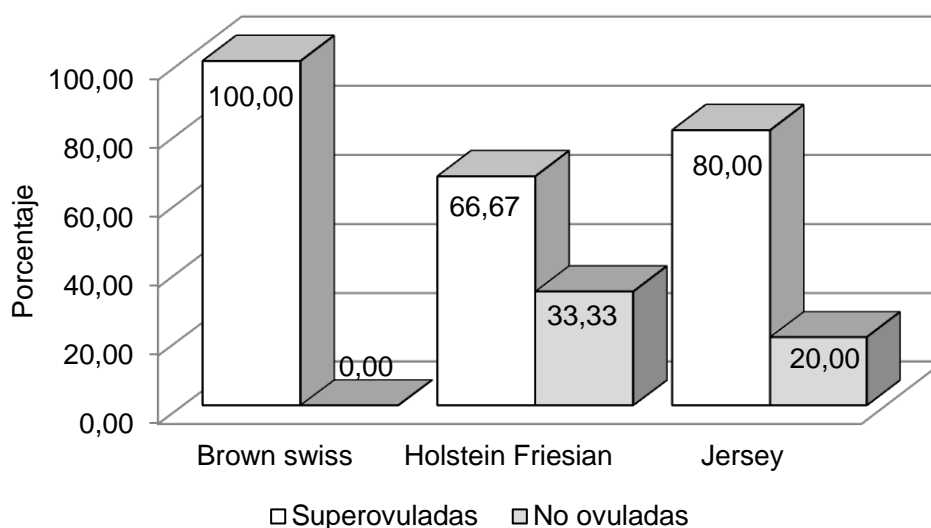


Gráfico 6. Efecto de dos programas de superovulación, en vacas lecheras según el grupo genético.

C. ESTRUCTURAS Y EMBRIONES COLECTADOS

La evaluación de los embriones después de su recuperación es el elemento fundamental para su posterior manipulación (congelación y transferencia); por el momento y en las condiciones de campo en las que habitualmente se trabaja, el criterio de valoración morfológico es el más utilizado, obteniéndose resultados fiables (De la Fuente, J. 2004).

En el cuadro 15, se resumen los estados de las estructuras de los embriones colectados por efecto de los dos programas de superovulación aplicados y que

para su comprensión se van detallando sus características particulares, ya que además, los ovocitos producidos por hembras superovuladas, en muchos casos, no son liberados simultáneamente sino en un período de varias horas, en este sentido Palma, G. (2010), observó que vacas superovuladas comenzaban a ovular 24 horas después del pico de LH prolongándose la ovulación aún 33 horas después del mismo. En consecuencia, los ovocitos liberados no son fertilizados en el mismo momento. También puede ocurrir que el desarrollo de los ovocitos, fertilizados al mismo tiempo, no sea sincrónico. La consecuencia práctica de estos fenómenos es que los embriones obtenidos de una vaca donante se encuentren en diferentes estadios de su desarrollo (mórulas y blastocistos). Estas diferencias pueden ser encontradas en una donante como también entre donantes, son dependientes del tipo de tratamiento hormonal y no son consideradas como anómalas.

Cuadro 15. ESTRUCTURAS Y EMBRIONES RECOLECTADOS DE VACAS DE DIFERENTES RAZAS POR EFECTO DE DOS PROGRAMAS DE SUPEROVULACIÓN.

	T1			T2			Tcal	Prob.
	Obs.	Media	D.E.	Obs.	Media	D.E.		
Total	10	8,40	± 4,14	11	10,73	± 7,00	-0,937	0,181
Ovulo	0			3	2,33	± 2,31		
Mórula temprana	1	4,00		4	7,75	± 2,22	-3,382	**
Mórula compacta	5	6,40	± 0,55	8	7,50	± 2,22	-0,413	0,346
Mórula expandida	3	3,67	± 2,31	2	3,00	± 2,83	0,277	0,404
Blastocisto	6	4,00	± 1,67	1	5,00		-1,464	
Blastocisto temprano	0			1	1,00			
Blastocisto protruido	1	2,00		0				
Embrión degenerado	4	2,75	± 2,87	5	1,60	± 0,55	0,789	0,244

T1: Dispositivos intravaginales de P4 (DIB) + EB sin GnRH en la 1ª I.A.

T2: Dispositivos intravaginales de P4 (DIB) + EB + GnRH en la 1ª I.A.

D.E.: Desviación estándar

Prob. > 0.05 no existen diferencias estadísticas.

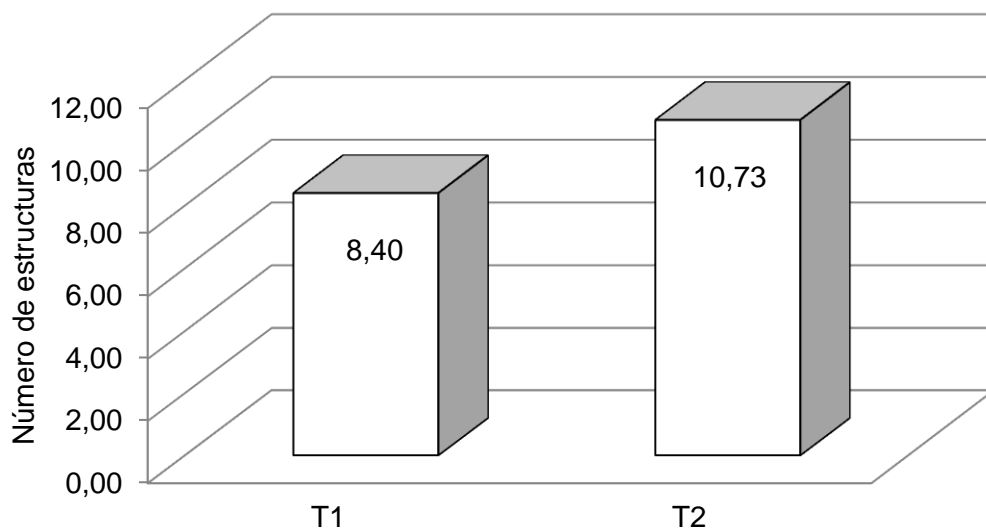
** : Existen diferencias estadísticas altas.

Fuente: Andino, P. (2013).

1. Total de estructuras colectadas

El número de estructuras recuperadas por colecta que se obtuvo en el presente estudio fue similar estadísticamente (Prob.> 0.05), por efecto de los dos

programas de superovulación aplicados, aunque numéricamente existen diferencias, por cuanto de las 12 vacas que no recibieron la aplicación de GnRH en la 1ª IA, se encontró que de los 10 animales que superovularon presentaron 8.40 ± 4.14 estructuras en promedio, en cambio que con la aplicación de GnRH en la 1ª IA, de las 11 vacas que superovularon se colectaron 10.73 ± 7.00 estructuras (Gráfico 7), notándose que esta superioridad puede estar supeditada a que con la aplicación de la GnRH al momento de la inseminación artificial se garantiza la sincronización de la inseminación con la ovulación, previenen problemas de ovulación retardada y mejoran el desarrollo del cuerpo lúteo (Ayala, D. y Castillo, O. 2010).



T1: Dispositivos intravaginales de P4 (DIB) + EB sin GnRH en la 1ª I.A.
T2: Dispositivos intravaginales de P4 (DIB) + EB + GnRH en la 1ª I.A.

Gráfico 7. Cantidad de estructuras colectadas por efecto de dos programas de superovulación, en vacas lecheras de diferentes razas.

Estas respuestas obtenidas son superiores a las encontradas por Betancourth, J. y Cáceres, G. (2011), quienes al evaluar la superovulación y transferencia de embriones con la aplicación de dos protocolos hormonales utilizando Folltropin® y Pluset®, en 10 vacas de las razas Holstein, Pardo Suizo y Jersey divididas en dos grupos de cinco vacas cada uno; establecieron que el número de embriones producidos por vaca fueron de 8.6 y 6.5 embriones/vaca con el empleo de Folltropin® y Pluset®, respectivamente. En cambio guardan relación con el reporte de Castrillón, M. (2011), quien al evaluar la respuesta a

la superovulación y calidad de los embriones en bovinos lecheros de elevado mérito genético, con la aplicación de un CIDR impregnado con 1,9 g de Progesterona, en forma conjunta con 5 mg de 17 β estradiol Burnet siete días antes del comienzo del tratamiento. A partir del día cero, dos inyecciones diarias de FSH (Foltropin) durante 4 días, en dosis diarias repartidas cada 12 horas, decrecientes de 80-60-40-20 mg, por animal. La primera dosis de prostaglandina F2 α a las 48 horas del día cero. El retiro del dispositivo a las 60 horas de iniciado el tratamiento, junto a la 2da dosis de PG; en la colecta de embriones obtuvieron $9,10 \pm 0,59$, estructuras totales

2. En base al desarrollo embrionario

Tomando como referencia el desarrollo embrionario señalado por Palma, G. (2010), quien indica que la edad del embrión es establecida a partir del día del estro (día 0). Al día 1 le corresponde la ovulación. De esta forma entre 24 y 36 horas después de la fertilización el cigoto de una célula se divide en 2 células ovales (día 2); 24 horas más tarde (día 3) el embrión cuenta ya con 4 células. La división de los blastómeros puede cumplirse en forma asincrónica, razón por la cual es posible observar en estadios tempranos un número impar de células. Hasta el estadio de 8 células (día 4) el cigoto es transportado a través del oviducto. El día 5 (aproximadamente) se produce el ingreso al cuerno uterino en estadio de 16 células, momento a partir del cual es posible obtener el embrión en forma no quirúrgica y evaluarlo de acuerdo a su estadio y calidad.

En este sentido, Orellana, J y Peralta, E. (2007), manifiestan que el efecto que puede llegar a tener el estadio de desarrollo embrionario sobre los porcentajes de preñez es un factor que ha sido estudiado por diversos autores con resultados dispares. En algunos casos, blastocistos tempranos y blastocistos resultaron en mayores porcentajes de preñez que mórulas, blastocistos expandidos y blastocistos protruidos. Otros autores, obtuvieron mejores resultados con blastocistos que con mórulas. Contrariamente, otros autores no han hallado efecto del estadio de desarrollo.

a. Óvulos

La ovulación abarca la maduración progresiva del folículo ovárico que culmina con el rompimiento de sus paredes y la liberación del óvulo maduro. Se presenta en el bovino entre 25 y 30 horas después de la iniciación del estro, teniendo un tiempo de vida fecundante de 12 a 24 horas (Rodríguez, J. et al. 2004), por lo que en este sentido la presencia de óvulos durante la colecta de embriones se considera como estructuras no viables o no fecundadas, encontrándose en el estudio tres vacas del tratamiento T2 de las que se recolectaron en promedio 2.33 ± 2.31 óvulos/vaca, en cambio que de ninguna de las vacas sometidas al tratamiento 1 (sin GnRH), se determinaron óvulos en los productos obtenidos.

b. Mórula temprana

Dentro del día 5, el cigoto continúa su desarrollo a 32 blastómeros y su forma es similar a la de una mora, razón por la cual se lo denomina mórula temprana, en la cual es posible distinguir individualmente a los blastómeros. Su masa celular ocupa casi todo el espacio perivitelino (Palma, G. 2010).

De los resultados obtenidos en la colecta se encontró que de las vacas del tratamiento sin la aplicación de GnRH en la 1ª IA, solo una presentó en promedio 4.00 mórulas tempranas; en cambio que con la aplicación de la GnRH en la 1ª IA se observaron en 4 animales con una media de 7.75 ± 2.22 mórulas tempranas/animal, por lo que estas diferencias entre las respuestas pueden atribuirse a que la GnRH prolonga la vida media del cuerpo lúteo mediante la luteinización de folículos que deberían normalmente causar luteólisis y/o inducir un cuerpo lúteo (CL) accesorio, de ahí que la sobrevivencia embrionaria podría ser mejorada por el incremento de la vida media del CL permitiendo al "conceptus" estar sujeto a un mejor ambiente uterino durante más tiempo y así estar en posibilidades de secretar oportunamente la señal embrionaria que es necesaria para establecer la gestación, mejorando así la fertilidad (Cervera, D. et al. 2011).

c. Mórula compacta

Entre los días 5 y 6, se presenta aproximadamente entre 32 y 64 blastómeros. Sus blastómeros están unidos y constituyen una masa compacta que ocupa sólo el 60 a 70% del espacio perivitelino. La compactación es considerada como uno de los signos de diferenciación, aunque los blastómeros conserven su capacidad totipotente (capacidad de una célula de dirigir el desarrollo total de un organismo, es decir, células que tiene la capacidad de crecer, dividirse y dar lugar a un organismo completo).

Con la aplicación de la GnRH en la 1ª IA, existieron 8 vacas de las que se recolectaron en promedio 7.50 ± 2.2 mórulas compactas/animal, a diferencia de las vacas que no recibieron la GnRH en la 1ª IA, de las cuales solo cinco registraron 6.40 ± 0.55 mórulas compactas/animal, por lo que se establece que con la aplicación de la GnRH, se consigue una mejor respuesta ovulatoria, ya que la administración de GnRH induce la ovulación del folículo dominante y/o la luteinización del mismo o de los grandes folículos con el consecuente desarrollo de una nueva onda folicular a partir de la cual se obtendrá un nuevo folículo dominante y por consecuencia una mayor cantidad de óvulos fecundados después de la Inseminación artificial a tiempo fijo (González, R. 2012).

d. Blastocisto temprano

En el día 7, el embrión presenta entre 100 y 200 células y se conoce como blastocisto temprano. Se caracteriza por el comienzo del transporte de fluido en las células trofoectodérmicas y por la formación de una cavidad (blastocelo) en el interior del embrión, dando la apariencia de un anillo de sello. El blastocisto temprano ocupa del 70 al 80% del espacio perivitelino (Palma, G. 2010).

Determinándose en el presente trabajo que este estadio del embrión en la recolección realizada fue poco frecuente, por cuanto se estableció su presencia en una sola ocasión y que le corresponde a una vaca que recibió la aplicación de la GnRH en la 1ª IA.

e. Blastocisto

En el estadio de blastocisto, los blastómeros comienzan a diferenciarse dando origen a dos tipos de células, las células de trofoblasto y el macizo celular interno. Las primeras darán origen a la placenta y el macizo celular interno dará origen al feto. Es más fácil distinguir el macizo celular interno cuando el embrión se encuentra en el estado de Blastocisto expandido que en estadios anteriores. Los embriones que alcanzan esta fase presentan una mayor capacidad implantatoria, ya que han superado posibles bloqueos de desarrollo que se producen de manera habitual en fases tempranas (Palma, G. 2010).

En los resultados encontrados se determinó que las vacas que no recibieron la aplicación de la GnRH en la 1ª IA presentaron una mayor frecuencia de embriones en estado de Blastocisto por cuanto de las 12 vacas empleadas, seis de ellas presentaron en promedio 4.00 ± 1.67 blastocistos, en cambio que de las 12 vacas que recibieron la aplicación de la GnRH en la 1ª IA, únicamente un animal presentó embriones en este estadio en una cantidad de 5 blastocistos, respuestas que demuestran que sin la aplicación de la GnRH, la ovulación de las vacas fue temprana, ya que sus óvulos fertilizados alcanzaron el estadio de Blastocisto en mayor proporción, comportamiento que se debe a que el desarrollo embrionario está influenciado por los niveles de progesterona producidos por el cuerpo lúteo (CL) que controlan el ambiente del oviducto y del útero (González, R. 2012).

f. Blastocisto protruido

El Blastocisto protruido se caracteriza por que los embriones han abandonado la zona pelúcida, su forma es variable pudiendo ser esférica o colapsada, la identificación de este estadio puede ser dificultoso para el operador inexperto. Los embriones sin la zona pelúcida son extremadamente frágiles y pegajosos, razón por la cual se recomienda transferir los embriones antes de este estadio. Determinándose que este estadio del embrión se recolectó de una vaca que no recibió la aplicación de la GnRH en la 1ª IA, y que presentó en total 2 blastocistos protruidos, considerándose a este como no apto para ser utilizado.

g. Embrión degenerado

Los embriones degenerados, son embriones cuyas blastómeras se encuentran en desorden y sueltas. Hay muchas vesículas. Puede tener un aspecto granular como los infertilizados y tener un crecimiento retardado con respecto a los otros embriones de la colecta. Estos embriones no se congelan ni se transfieren en fresco (Serrano, J. 2009).

Los embriones degenerados, se encontraron en los dos grupos de vacas estudiados, por cuanto con el tratamiento que consideraba la no aplicación de GnRH en la 1ª IA, se encontró 4 animales que presentaron en promedio 2.75 ± 2.87 embriones degenerados; de igual manera en el tratamiento con la aplicación de la GnRH en la 1ª IA, se observaron 5 animales con una media de 1.60 ± 0.55 embriones degenerados, mórulas tempranas/animal, por lo que estas diferencias entre las respuestas pueden atribuirse a que la GnRH prolonga la vida media del cuerpo lúteo mediante la luteinización de folículos que deberían normalmente causar luteólisis y/o inducir un cuerpo lúteo (CL) accesorio, de ahí que la sobrevivencia embrionaria podría ser mejorada por el incremento de la vida media del CL permitiendo al “conceptus” estar sujeto a un mejor ambiente uterino durante más tiempo y así estar en posibilidades de secretar oportunamente la señal embrionica que es necesaria para establecer la gestación, mejorando así la fertilidad (Cervera, D. et al. 2011).

D. EMBRIONES VIABLES Y NO VIABLES

1. De acuerdo a los tratamientos

Las cantidades de embriones viables obtenidos por efecto de la aplicación de los dos programas de superovulación, no presentaron diferencias estadísticas ($P > 0.05$), entre las medias de los tratamientos (Cuadro 16), sin embargo numéricamente se pudo recolectar una mayor cantidad en las vacas que recibieron la aplicación de la GnRH en la 1ª IA, y que fueron de 9.36 ± 6.09 embriones viables/vaca; en cambio que de los animales que no se empleó la GnRH en la 1ª IA, se colectaron un total de 7.10 ± 3.54 embriones viables/vaca,

determinándose además que a mayor cantidad de embriones viables obtenidos menores proporciones de embriones no viables se registraron, por cuanto se encontraron 2.50 ± 2.35 y 3.25 ± 3.86 embriones no viables/animal, de las vacas que recibieron y no la aplicación de GnRH en la 1ª IA (Gráfico 8); por lo que se establece que con la aplicación de la GnRH para sincronizar la ovulación se consigue una respuesta aparentemente mejor, que se debe a que la GnRH, actúa sobre la adenohipófisis y causa la secreción de FSH y LH, lo que induce el crecimiento de folículos inmaduros y la ovulación de folículos maduros, estado que en el bovino se presenta entre 25 y 30 horas después de la iniciación del estro, existiendo por tanto una mejor sincronía en el crecimiento del folículo y por ende en la ovulación (Carvajal, R. 2009), por lo que al aplicarse junto con la inseminación artificial permite obtener una mayor cantidad de embriones viables.

Cuadro 16. EMBRIONES VIABLES Y NO VIABLES COLECTADOS DE VACAS DE DIFERENTES RAZAS POR EFECTO DE DOS PROGRAMAS DE SUPEROVULACIÓN.

	Viables			No viables		
	Media		D. Est.	Media		D. Est.
Tratamientos						
T1	7,10	\pm	3,54	3,25	\pm	3,86
T2	9,36	\pm	6,09	2,50	\pm	2,35
Tcal	-1,050			0,350		
Prob.	0,154			0,373		
Raza						
Brown swiss	10,00	\pm	5,46	3,25	\pm	3,06
Holstein Friesian	6,00	\pm	2,45	1,00		
Jersey	5,00	\pm	3,27	1,00		

T1: Dispositivos intravaginales de P4 (DIB) + EB sin GnRH en la 1ª I.A.

T2: Dispositivos intravaginales de P4 (DIB) + EB + GnRH en la 1ª I.A.

D.Est.: Desviación estándar.

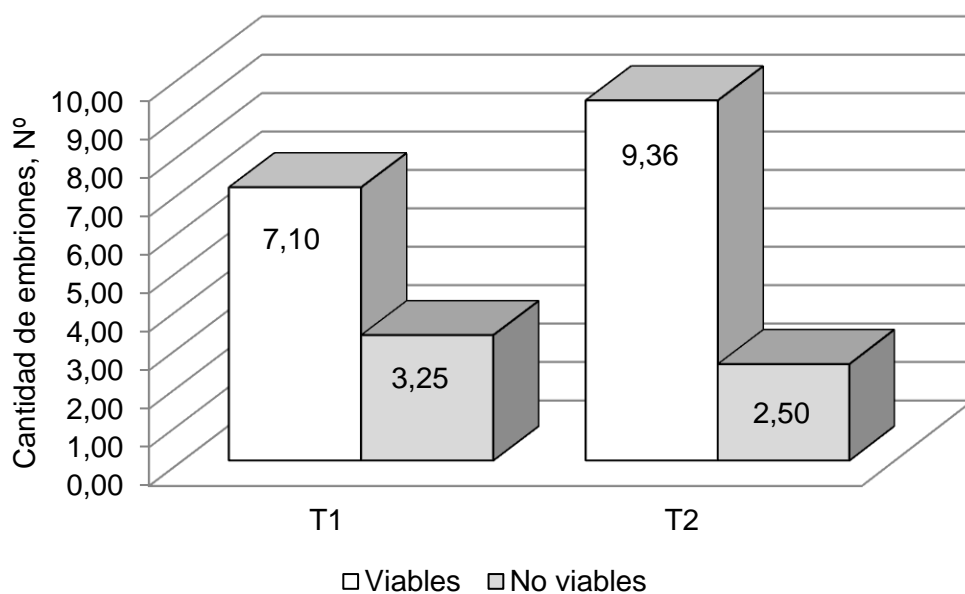
Prob. > 0.05 no existen diferencias estadísticas.

** : Existen diferencias estadísticas altas.

Fuente: Andino, P. (2013).

En los resultados obtenidos por no haberse encontrado diferencias estadísticas, este comportamiento concuerda con lo indicado por Maldonado; J. y Paula, V. (2008), quienes al efectuar una revisión sobre el uso de hormonas

en los esquemas de superovulación y sincronización de donadoras, con énfasis en la racionalidad del uso de las hormonas, establecen que las tasas de embriones transferibles no parecen variar significativamente entre tratamientos, obteniendo en promedio 6.17 ± 1.37 embriones viables/vaca; además las respuestas encontradas coinciden con varios estudios realizados como los de Arias, M. (2010), quien al realizar una comparación técnica y económica de dos métodos de mejoramiento genético para la transferencia de embriones y fertilización in vitro determinó en promedio $8,8 \pm 6,6$ embriones viables por vaca, en el mismo sentido Castrillón, M. (2011), al evaluar la respuesta a la superovulación y calidad de los embriones en bovinos lecheros de elevado mérito genético, con la aplicación de un CIDR impregnado con 1,9 g de Progesterona, en forma conjunta con 5 mg de 17β estradiol Burnet siete días antes del comienzo del tratamiento, en la colecta obtuvo $9,10 \pm 0,59$, embriones viables/vaca



T1: Dispositivos intravaginales de P4 (DIB) + EB sin GnRH en la 1ª I.A.
T2: Dispositivos intravaginales de P4 (DIB) + EB + GnRH en la 1ª I.A.

Gráfico 8. Cantidad de embriones viables y no viables obtenidos por efecto de dos programas de superovulación, en vacas lecheras de diferentes razas.

2. De acuerdo a la raza

Al evaluar la cantidad de embriones viables obtenidos en las vacas de acuerdo al grupo genético, se encontró que existen marcadas diferencias, por cuanto de los animales de la raza Brown swiss se colectaron 10.00 ± 5.46 embriones viables/vaca, reduciéndose a 6.00 ± 2.45 embriones viables en las Holstein Friesian y de apenas 5.00 ± 3.27 embriones en las vacas de raza Jersey (Gráfico 9); estos resultados demuestran lo enunciado por Rodríguez, J. et al. (2007), quienes señalan que la raza tiene un efecto directo con respecto al tamaño del folículo ovulatorio y el número de células de la granulosa, lo cual puede ejercer un efecto positivo o negativo sobre las tasas de fertilidad de los óvulos, por consiguiente estable que los resultados de la transferencia de embriones están supeditados a la calidad del embrión y al grupo racial o cruce de las vacas donadoras; aunque Cutini, A., et al. (2000), indican que en la selección de donadoras, es más importante las condiciones de crianza, el manejo sanitario y el estado nutricional de las mismas que su raza o categoría.

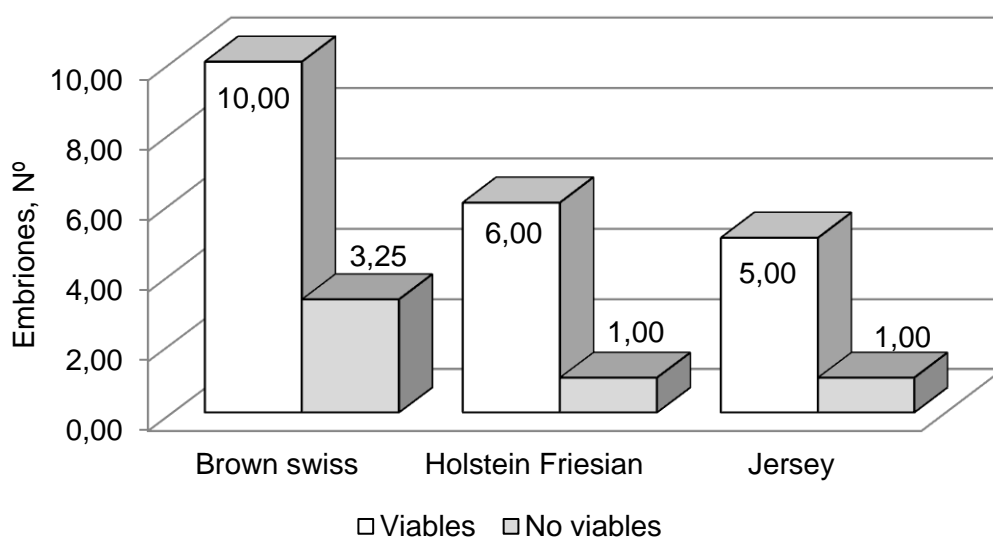


Gráfico 9. Cantidad de embriones viables y no viables obtenidos según el grupo genético de las vacas lecheras sometidas a dos programas de superovulación.

E. PORCENTAJE DE EMBRIONES VIABLES Y NO VIABLES

Los porcentajes de embriones viables conseguidos por efecto de los programas

de superovulación no fueron significativos según la prueba Ji cuadrado ($X^2_{cal} < X^2_{tab}$), por cuanto los valores alcanzados fueron de 84.50 % y 87.30 % embriones viables con respecto al total de estructuras colectadas y que corresponden a los grupos de las vacas que no recibieron y de aquellas que recibieron la GnRH al momento de la 1ª IA, respectivamente (Cuadro 17, Gráfico 10), por lo que se establece que con la aplicación de la GnRH estadísticamente no se mejoran los índices productivos en la colección de embriones, a pesar de que numéricamente sus respuestas son más altas, pero que en todo caso se confirma lo señalado por Palma, G. (2010), quien indica que las donantes difieren en su respuesta superovulatoria por factores que dependen de sus cualidades genéticas, edad, estado fisiológico y salud reproductiva. Todos estos factores se traducen en diferencias cuantitativas y cualitativas. Las últimas son importantes de reconocer para determinar qué embriones están en condiciones de desarrollar y concluir en un ternero vivo, qué embriones están degenerados y cuáles presentan anormalidades que permiten tener solo reducidas expectativas de sobrevivencia, además, esta baja producción de embriones viables, también puede estar supeditada al momento de la inseminación artificial, ya que según Castrillón, M. (2011), en la inseminación artificial, un 10% de los ovocitos no son fecundados debido a que en el animal superovulado, las primeras ovulaciones ocurren más temprano que en las hembras no superovuladas y se requieren de la presencia de semen viable durante el periodo en el que ovulan el resto de los folículos ováricos.

Cuadro 17. PORCENTAJE DE EMBRIONES VIABLES Y NO VIABLES COLECTADOS DE VACAS DE DIFERENTES RAZAS POR EFECTO DE DOS PROGRAMAS DE SUPEROVULACIÓN.

	Viables	No viables	Total	X ² cal	X ² tab
Tratamientos				0,32	3,84
T1	84,50	15,50	100		
T2	87,30	12,70	100		
Raza				13,02	5,99
Brown swiss	83,33	16,67	100		
Holstein					
Friesian	96,00	4,00	100		
Jersey	95,24	4,76	100		

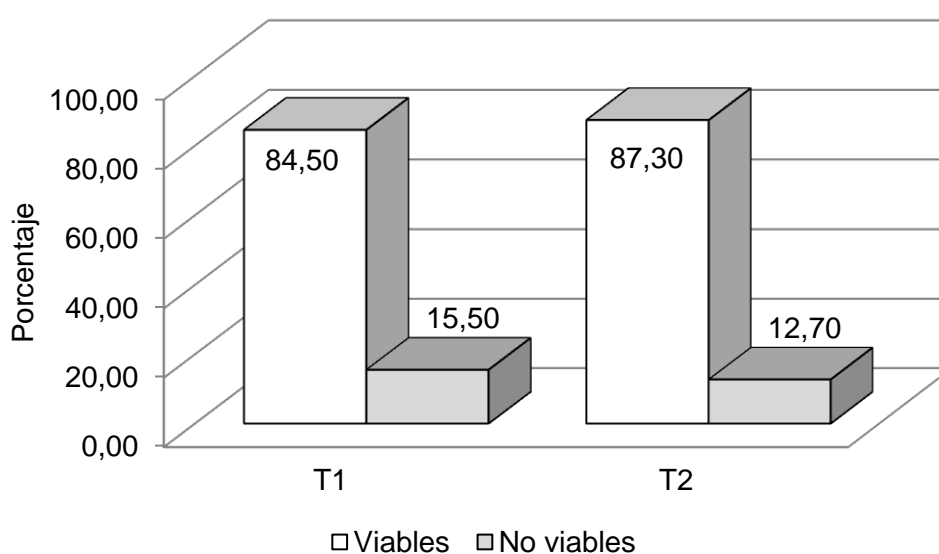
T1: Dispositivos intravaginales de P4 (DIB) + EB sin GnRH en la 1ª I.A.

T2: Dispositivos intravaginales de P4 (DIB) + EB + GnRH en la 1ª I.A.

X²cal < X² tab

Fuente: Andino, P. (2013).

En el mismo sentido, Arias, M. (2010), señala que las vacas sometidas a tratamientos hormonales con el propósito de producir ovulaciones múltiples, generalmente presentan un alto porcentaje de ovocitos no fecundados en el lavado uterino, por cuanto en su trabajo al realizar una comparación técnica y económica de dos métodos de mejoramiento genético para la transferencia de embriones y fertilización in vitro determinó que de las estructuras recuperadas solamente el 74.5 % fueron embriones viables.



T1: Dispositivos intravaginales de P4 (DIB) + EB sin GnRH en la 1ª I.A.

T2: Dispositivos intravaginales de P4 (DIB) + EB + GnRH en la 1ª I.A.

Gráfico 10. Porcentaje de embriones viables y no viables obtenidos por efecto de dos programas de superovulación, en vacas lecheras.

La raza de las vacas tuvo una influencia directa en el porcentaje colectado de embriones viables, por cuanto la prueba de X^2 establece diferencias significativas entre grupos genéticos ($X^2_{cal} > X^2_{tab}$), presentando las vacas de la raza Holstein Friesian el mayor porcentaje de embriones viables que es del 96.00 %, siguiéndoles en importancia las vacas Jersey con el 95.24 %, en tanto que las menores proporciones se determinó en las vacas Brown swiss, con el 83.33 % (Gráfico 11), por consiguiente la esta variabilidad de las respuestas de acuerdo al grupo genético es un factor siempre presente y no controlable en los tratamientos para inducir la superovulación y la colección de embriones viables, por cuanto Apreza, V. (2009), sostiene que existen grandes diferencias en cuanto al tratamiento no sólo entre especies bovinas, sino entre animales de la misma especie y entre un mismo individuo, y es por esto que la respuesta al tratamiento es muy variable; el mayor problema que existe en la variabilidad a la respuesta de la ovulación múltiple se da dependiendo del desarrollo de los folículos al momento de iniciar el programa, ya que es muy difícil predecir el inicio de la oleada folicular, además, la diferencia de calidad entre los embriones se puede deber a la respuesta de la ovulación múltiple alta, por cuanto de un número elevado de embriones obtenidos, también se incrementa la producción de embriones de mala calidad, como puede ser el caso de la raza Brown swiss.

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, es necesario recalcar lo que señala Cazco, M. (2001), en que es necesario tener en cuenta que estas respuestas pueden variar de acuerdo a la población bovina evaluada, ya que en lotes grandes las respuestas pueden ser relativamente diferentes, ya sea por el número de animales o porque dentro de un hato lechero va a existir grandes diferencias individuales.

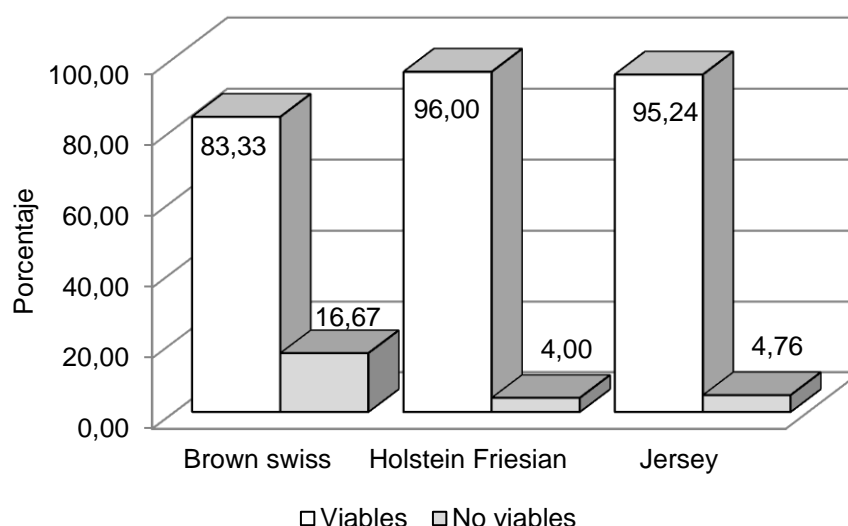


Gráfico 11. Porcentaje de embriones viables y no viables obtenidos de acuerdo al grupo genético de vacas lecheras sometidas a dos programas de superovulación.

F. EVALUACIÓN ECONÓMICA

El análisis económico realizado para establecer el costo por embrión viable por efecto de la utilización de los programas de superovulación empleados, se reporta en el cuadro 18, el mismo que permite establecer que con la utilización de la GnRH después de la 1ª IA, cada embrión viable obtenido presenta un costo de 54.47 dólares US, siendo inferior con respecto a los embriones obtenidos de las vacas que no recibieron la aplicación de la GnRH al momento de la IA, por cuanto su costo se elevó a 71.58 dólares, por lo tanto se considera que mejores respuestas económicas se consiguieron al aplicarse la GnRH al momento de la 1ª IA, ya que además de producir menores costos por embrión viable, con este tratamiento también se logró numéricamente mejores respuestas en la cantidad de animales que superovularon, en las estructuras totales colectadas y por consiguiente mayor cantidad de embriones viables, por lo que en base a estas consideraciones se puede establecer que al utilizar la GnRH al momento de la inseminación se obtendrán mejores resultados productivos en la colecta de embriones viables para su conservación y posterior uso para la transferencia de embriones.

Cuadro 18. ANÁLISIS ECONÓMICO (DÓLARES) DEL COSTO POR EMBRIÓN VIABLE COLECTADO DE VACAS LECHERAS DE DIFERENTES RAZAS POR EFECTO DE DOS PROGRAMAS DE SUPEROVULACIÓN.

Concepto	Cantidad dosis	Dosis/vaca		Precio unidad	Sub total	
		T1	T2		T1	T2
Implante DIB	Unidad	1	1	10,00	10,00	10,00
Benzoato de estradiol (Syntex)	1 ml	1	1	2,00	2,00	2,00
FSH (Foltropin)	2,5 ml	8	8	28,13	225,00	225,00
PGF2 α (Lutalyse)	5 ml	2	2	4,17	8,34	8,34
GnRH (Gonaxal)	2,5 ml		1	3,80		3,80
Pajuelas de semen	unidad	3	3	15,00	45,00	45,00
Anestesia	100 ml	1	1	2,50	2,50	2,50
Equipo y materiales						
Equipo recolección de embriones	Unidad	1	1	40,00	40,00	40,00
Medio de lavado y cultivo	Unidad	1	1	80,00	80,00	80,00
Pajuela irradiada	Unidad	1	1	7,00	7,00	7,00
Tapón para pajuela	Unidad	1	1	2,00	2,00	2,00
Nitrógeno liquido	Unidad	1	1	2,50	2,50	2,50
Jeringuillas	Unidad	13	13	0,30	3,90	3,90
Mano de Obra						
Inseminación	Servicio	3	3	10,00	30,00	30,00
Recolección de embriones	Servicio	1	1	50,00	50,00	50,00
Costo Total					508,24	512,04
Número de embriones viables					7,10	9,40
Costo/embrión viable, dólares					71,58	54,47

T1: Dispositivos intravaginales de P4 (DIB) + EB sin GnRH en la 1ª I.A.

T2: Dispositivos intravaginales de P4 (DIB) + EB + GnRH en la 1ª I.A.

Fuente: Andino, P. (2013).

VIII. CONCLUSIONES

- Caracterizando a las 24 vacas que formaron parte de la investigación, el 54.17 % fueron Brown swiss, con una edad de 7.54 ± 3.31 años y una condición corporal de 3.56 ± 0.33 (en la escala de 1 a 5); el 25 % fueron Holstein Friesian con 6.50 ± 1.64 años y condición corporal de 3.33 ± 0.20 ; y el 20 % fueron Jersey con 9.00 ± 4.00 años y 3.25 ± 0.18 de condición corporal, por lo que se consideraron idóneas para la aplicación de los programas de superovulación.
- Los programas de superovulación utilizados (Dispositivos intravaginales de P4 (DIB) + EB + la aplicación o no GnRH durante la primera inseminación artificial), presentaron respuestas similares estadísticamente, sin embargo las vacas que recibieron la GnRH numéricamente mostraron un mayor número de animales que superovularon (91.67 % frente al 83.33 %), mayor cantidad de estructuras totales colectadas (10.73 ± 7.00 frente a 8.40 ± 4.14 por vaca) y embriones viables (9.36 ± 6.09 vs 7.10 ± 3.54 por vaca), que corresponden al 87.30 % y 84.50 % respectivamente.
- La raza de los animales tuvo una influencia directa en los parámetros evaluados, por cuanto se encontraron diferencias estadísticas, ya que las respuestas de superovulación se registró en el 100 % de las vacas Brown swiss, el 80 % en las Jersey y el 66.67 % en las Holstein Friesian; de estas, se colectaron 10.00 ± 5.46 embriones viables/vaca en las Brown swiss, 6.00 ± 2.45 embriones viables en las Holstein Friesian y 5.00 ± 3.27 embriones en las Jersey; expresando en porcentaje en base al total colectado, las vacas Holstein Friesian presentaron el mayor porcentaje de embriones viables (96.00 %), siguiéndoles en importancia las vacas Jersey (95.24 %), y en menor proporción las vacas Brown swiss (83.33 %).
- El análisis económico determina que con la aplicación de GnRH después

de la 1ª IA, cada embrión viable obtenido tiene un costo de 54.47 dólares, que es inferior a los embriones obtenidos de las vacas que no recibieron la aplicación de la GnRH, por cuanto su costo se elevó a 71.58 dólares.

IX. RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede realizar las siguientes recomendaciones:

- Provocar la superovulación en vacas lecheras en base a implantes de dispositivos intravaginales de P4 (DIB) + EB más la aplicación de GnRH durante la primera Inseminación artificial, para mejorar la cantidad y calidad de los embriones a colectar, por cuanto con este protocolo hormonal se consigue numéricamente una mejor proporción de animales con múltiples ovulaciones, mayor cantidad de embriones viables, con un costo por embrión viable relativamente bajo (54.47 dólares).
- Replicar el trabajo, pero con un mayor número de animales usando diferentes razas o cruas en iguales proporciones, para establecer si los resultados obtenidos se mantienen o si existe variación por el número de animales evaluados.
- Continuar con el estudio de la recolección de embriones y su efecto en la transferencia de embriones, para establecer los porcentajes de preñez y determinar los costos que representan por cada ternero obtenido con esta biotecnología.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. **CUPPS, P.**, Reproduction in domestic animals., 4.ed., San Diego., Estados Unidos., Academic Press., 1991., 670 Pp.
2. **CHURCH D., Y OTROS.**, Fundamentos de nutrición y alimentación de animales., Limusa Wiley., 2 ed., DF México., México 2002., Pp 41-50.
3. **GORLACH, A.**, Transferencia de embriones en el ganado vacuno. 1a ed., Edit. Acribia., Madrid., España., 2005., Pp. 35-65.
4. **HINCAPIÉ, J.**, Anatomía y fisiología de los animales domésticos., Ed. Litocom., Tegucigalpa., Honduras., 2004., P 167.
5. **ILLERA, M.**, Reproducción de los animales domésticos., AEDOS. Madrid., España., 1994., P 390 .
6. **MERCK.**, El Manual Merck de Veterinaria., 5. ed., Océano Grupo Editorial., Barcelona., España., 2000., P

2259.

7. **RIVAS, R. Y BARCELO, M.**, Manual de prácticas de biología de la reproducción., Universidad Autónoma de Ciudad Juárez., Academia de Biología., Ciudad Juárez., Chihuahua., México., 2011., Pp. 15-56.
8. **ABS., A.I.** Management Manual., 5ta Ed., Volume 2., Wisconsin., Estados Unidos., 2006., Pp 12 – 15.
9. **BO, G. Y CACCIA, M.**, Dinámica folicular en bovinos., En: Reproducción en los animales domésticos., Tomo 1., Ungerfeld, R, (ed)., Melibea ediciones., Buenos Aires., Argentina., 2002., pp 55-68.
10. **FOSADO, M.**, Efecto de los estrógenos. Genetic Resources International and Sexing Technologies., Wisconsin., Estados Unidos., 2007. Pp 6.
11. **GIBBONS, A. Y CUETO, M.**, Manual de transferencia de embriones en ovinos y caprinos., INTA EEA Bariloche., Argentina, Centro Regional Patagonia Norte., Edit. Sitio Argentino de Producción Animal., Patagonia., Argentina 2010., Pp. 4 – 23.

12. **HANSELMANN, D.**, Was beeinflusst den Erfolg bei der Superovulation Tterzuchter., 1995., pp 28-29.
13. **RELLANA, J. Y PERALTA, E.**, Manual de procedimientos para el laboratorio de transferencia de embriones en bovinos de la empresa Genetic Resources International (GRI) and Sexing Technologies. Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria. Zamorano., Honduras., 2007., pp 10-25.
14. **SARTORI, R.**, Influencia de la Nutricion en la función reproductiva de la vaca lechera. Embrapa Recursos Geneticos y Biotecnologia., DF., 1ra ed., Brasilia., Brasil., 2006., Pp 48-80.
15. **GALINDO, R.**, Transferencia de Embriones., Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Centro de enseñanza, investigación y extensión en ganadería tropical., DF México., Edit. Universidad Autónoma de México., México 2004., Pp 18.
E-books
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/>
16. **GAZQUE, R.**, Enciclopedia Bovina., 1a ed. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad

Nacional Autónoma de México., México., 2008.,
Pp 406.
E-books
<http://www.slideshare.net/>

17. **CURTIS, J.** Manual de Procedimiento de Transferencia de Embriones., Manhattan Kansas., Estados Unidos., 2009., Pp 3.
E-books.
www.agtechinc.com

18. **GONZÁLEZ, R.,** Reproducción bovina. Capítulo XXV. Procedimientos en los programas de trasplante de embriones en ganado bovino., Asociación Venezolana de Producción Animal., Caracas., Venezuela., pp 391 – 409. 2012.
E-books
<http://www.avpa.ula.ve>.

19. **JIMÉNEZ, C.,** Superovulación: estrategias, factores asociados y predicción de la respuesta superovulatoria en bovinos. Facultad de medicina Veterinaria y de Zootecnia., Sede Bogotá., Universidad Nacional de Colombia., Rev. Med. Vet. Zoot., 2009., Pp 195-214.
E-books.

<http://www.revistas.unal.edu.co>

20. **ROCHA C. Y CORDOVA A.**, Causas de retención placentaria en el ganado Bovino., Revista electrónica de Clínica Veterinaria., Vol. III, N. 2., 2008., Pp 3,6.
E-books.
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

21. **CERVERA, D., Y OTROS.**, Efecto de un tratamiento con GnRH en el diestro en ovejas de pelo receptoras de embriones. Centro de Selección y Reproducción Ovina. División de Estudios de Posgrado e Investigación. Instituto Tecnológico de Conkal., Yucatán., México. Información Técnica Económica Agraria, Vol. 107 N.º 1., 2011., Pp. 59-63.
E-books
<http://www.aida-itea.org>.

22. **CUTINI, A., Y OTROS.**, Factores que determinan el resultado de la transferencia no quirúrgica de embriones bovinos. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires., Revista Taurus N° 7: 28-39 y N° 8: 2000., Pp.35-47.
E-books
<http://www.vet.unicen.edu.ar>.

23. **DE LA FUENTE, J.**, Transferencia de embriones en ganado bovino., Instituto de Estudios de Postgrado. Universidad de Córdoba., Argentina., 2004., Pp 375-382.
E-Boocks.
http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/libro
24. **MALDONADO; J. Y PAULA, V.**, Racionalidad de los esquemas de superovulación y sincronización en la transferencia de embriones en bovinos: ¿terapéutica basada en la evidencia o ausencia de ética?. Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia., Rev Colomb Cienc Pecu., Medellín., Colombia., 2008., 351-364.
E-books
<http://rccp.udea.edu.co>.
25. **RODRÍGUEZ, J., Y OTROS.**, Análisis multifactorial de las tasas de preñez en programas de transferencia de embriones en Colombia., Facultad de Ciencias Agrarias., Universidad de Antioquia., Colombia., Rev. MVZ Córdoba vol.12 no.2. Córdoba July/Dec. 2007.
E-books
<http://www.scielo.org.co>.

26. **WALENCIAK, D.**, Hechos sobre transferencia embrionaria; ya no hay más límites. Hereford, Bs. As., Pp.48-58., 2005.
E-books
<http://www.produccion-animal.com.ar>.
27. **BOLÍVAR, P. Y MALDONADO.**, Proliferación de esquemas de superovulación y sincronización en la transferencia de embriones en bovinos: ¿Terapéutica basada en la evidencia o falta de racionalidad?., Rev Colomb Cienc Pecu 2008., Pp 436-450.
28. **CEBALLOS Y OTROS.**, Actividad de glutatión peroxidasa en bovinos lecheros a pastoreo correlacionada con la concentración sanguínea y plasmática de selenio., Pesq. Rev, agropec. bras., Brasília, v.34, n.12., 1999., Pp.2331-2338.
29. **CHENOWETH, P.**, Influence of the male on embryo quality., Theriogenology., 2007., 68 (3):308-315.
30. **FRAURE, R.**, Aspectos Biológicos y Productivos de la Pubertad de la hembra bovina., 2a ed. s/n., Edit. Therios., 2004., Pp.35-40.

31. **GREVE, Y OTROS.**, Characterisation of plasma LH-profiles in superovulated dairy cow., Theriogenology 1984., Pp327.
32. **HASLER, Y OTROS.**, Superovulatory responses of holsteincows., Theriogenology., 1983., Pp 83.
33. **LERNER, Y OTROS.**, Age, dose FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows., Anim Sci., 1986., Pp 63,176-183.
34. **LINDSELL, C. Y OTROS.**, Superovulatory and endocrines responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle., Theriogenology., 1986., Pp 209-219.
35. **MEYER, J., Y OTROS.**, Embryo production rates of cattle superovulated with and without the presence of and intravaginal progesterone releasing device. Theriogenology., 2000., Pp504.
36. **MONNIAUX, D., Y OTROS.**, Superovulatory responses of cattle. Theriogenology., 1983., Pp 55-81.

37. **MOOR, R., Y OTROS.**, Intraovarian control of folliculogenesis: Limits to superovulations., *Theriogenology.*, 1984., Pp 103-116.
38. **MOREIRA, Y OTROS.**, Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows., *Theriogenology.*, 2002; 57 (4): 1371-87.
39. **MORENO, D.**, Follicle wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and progesterone., *Theriogenology.*, 2004., Pp 408.
40. **NASSER, L., Y OTROS.**, Ovarian superestimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers., *Theriogenology* 1993., Pp 713-724.
41. **PEÑA, A., Y OTROS.**, El Papel de las Donadoras, de las receptoras y de los detectores de celo (Machos y Hembras) en la superovulación y transferencia de embriones., 3a ed., Buenos Aires., Argentina., Edit. Therios., 2001., pp. 1 -29.

42. **RAMÓN, J.**, Efecto de un tratamiento con GnRH en el diestro en ovejas de pelo receptoras de embriones. Centro de Selección y Reproducción Ovina. División de Estudios de Posgrado e Investigación. Instituto Tecnológico de Conkal., Yucatán., México., Información Técnica Económica Agraria., Vol. 107 N.º 1., 2011., Pp59-63.
43. **ROCHE J., Y OTROS.**, Reproductive management of postpartum cows., Anim Reprod Sci., 2000., Pp 60-61:703-712.
44. **WILLMOTT, Y OTROS.**, The effect of FSH/LH ratios in pituitary extracts on superovulatory response in the cows., Theriogenology., 1990., Pp 347.
45. **MAPLETOFT R.**, Memorias IX Simposio Internacional de Reproducción IRAC., Buenos Aires., Argentina., 2011. Pp12.
46. **MARTÍNEZ, D.**, Métodos de sincronización de receptoras. Una evaluación desde el punto de vista práctico. XVII Congreso Internacional ANEMBE (Asociación Nacional de Especialistas en Medicina Bovina de

España)., Santander., Espaaña., 2012.

E-books

www.anembe.com

47. **MANSPEAKER, J.**, Retained placentas Dairy integrated reproductive management. Universtity of Maryland and West Virginia University., Estados Unidos., 2005.

48. **REINOSO V, SOTO C.**, Importancia de la Vitamina E y el Selenio en vacas lecheras. Artigas, Uruguay., 2009.

49. **SILVA Y OTROS.**, Retención placentaria en la vaca lechera. Su relación con la nutrición y el selenio., 2002.

50. **CAIZA, F.**, Datos recopilados en los trabajos de campo., BIOGENSA. Riobamba., Ecuador., 2010.

51. **ECUADOR., GOBIERNO AUTÓNOMO DESCENTRALIZADO DE CHAMBO.**, Estación., Agrometeorológica., Chambo., Ecuador., 2012., Pp 10.

52. **ECUADOR., GOBIERNO AUTÓNOMO DESCENTRALIZADO DE CHUNCHI.,** Estación Agrometeorológica Chunchi., Ecuador., 2012. Pp 12.

53. **ECUADOR., GOBIERNO AUTÓNOMO DESCENTRALIZADO DE MEJÍA.,** Estación Agrometeorológica Clirsén. Ecuador. 2012. Pp 15.

54. **APREZA, V.,** Respuesta de ovulación múltiple y tasa de colección de embriones en hembras *Bos taurus* y *Bos indicus* a través del uso de prostaglandina F_{2α} y progesterona natural., Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Veracruzana. Veracruz, México., Tesis., 2009., Pp 18-24.

55. **ARIAS, M.,** Comparación técnica y económica de dos métodos de mejoramiento genético: Transferencia de Embriones y Fertilización in vitro en la hacienda El Trébol, Santa Cruz, Bolivia. Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria., Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano, Tegucigalpa, Honduras. Tesis., 2010., 18 p.
E-books
<http://bdigital.zamorano.edu>

56. **AYALA, D. y CASTILLO, O.**, Efecto de la aplicación de GnRH al momento de la inseminación artificial en vacas lecheras implantadas con dispositivos intravaginales., Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria., Escuela Agrícola Panamericana., Honduras Zamorano., Tesis., 2010., Pp. 2-3.

E-books

<http://bdigital.zamorano.edu>

57. **BETANCOURTH, J. Y CÁCERES, G.**, Superovulación y transferencia de embriones en vacas lecheras utilizando dos protocolos hormonales., Proyecto Especial Programa de Ingeniero Agrónomo., Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano., Tegucigalpa., Honduras., Tesis., 2011., 18 p.

E-books

<http://bdigital.zamorano.ed>

58. **CARVAJAL, R.**, Efecto de la aplicación de ECP o GnRH sobre la fertilidad de bovinos de doble propósito., Licenciatura en Zootecnia., Universidad del Papaloapan., Loma Bonita., Oaxaca., México., Tesis 2009., pp 26-28.

59. **CAZCO, M.**, Evaluación de la utilización de HCG+PF2 α VS GnRH+PF2 α en la sincronización de la ovulación en

vaconas Holstein mestizas en el cantón Morona.,
FCP., ESPOCH., Riobamba., Ecuador., Tesis.,
2001., pp 32-45.

60. **REYES, P.**, Superovulación y transferencia de embriones en
bovinos., Facultad de Medicina Veterinaria y
Zootecnia., Universidad Michoacan a de San
Nicolás de Hidalgo., Michoacan, México., Tesis.,
2010., pp 12. –34.

61. **AGRO CAPACITACIÓN ARGENTINA (AGROCOR).**, Curso
teórico práctico de inseminación artificial en bovinos.,
Córdoba., Argentina., 2005.
E-books
<http://www.produccion-animal.com.ar>.

62. **AGUILAR, J.**, Cursos De Producción Animal I. Fav Unrc.
Argentina., 2005.
E-books
<http://www.produccion-animal.com.ar>.

63. **ASPRÓN, P.**, Transferencia de embriones. 2001.
E-books
<http://www.panocipes.uson.mx>.

64. **ÁVILA, J.**, Importancia de donadoras y receptoras. Selección de receptoras y sincronización. Técnica de colección y recuperación de embriones., Transferencia de embriones., Memoria de Curso teórico-práctico sobre transferencia de embriones., México DF., 2009.

E-books

<http://www.viaiural.com.ar>

65. **BECALUBA, F.**, Factores que afectan la superovulación en bovinos., 2007.

E-books

<http://www.engormix.com>.

66. **CASTRILLÓN, M.**, Respuesta a la superovulación y calidad de los embriones en bovinos lecheros de elevado merito genético con el uso de diferentes protocolos. Facultad de Ciencias Agrarias., Universidad Nacional de Lomas de Zamora., Buenos Aires Argeentina., 2011.

E-books

<http://www.engormix>.

67. **DÍAZ, N.**, Mecanismos de acción hormonal y sistemas de retroalimentación positiva y negativa en el eje hipotálamo, hipófisis y ovario., Genetic Resources

International and Sexing Technologies., Estados Unidos., 2007.
E-books.
<http://www.engormix.com>.

68. **ESCURRA, L.**, Transferencia de embriones: Metodología de trabajo de manejo clásico de transferencia embrionaria., 2001.
E-books.
<http://www.viaiural.com.ar>.

69. **FERTIG, M. Y LUCHETTI, D.**, Bovinos: Manejo nutricional y condición corporal de la vaca de cría. Estación Experimental Agroforestal Esquel., Chubut., Carpeta Técnica., Ganadería N° 17, Octubre 2005., EEA INTA Esquel.,
E-books
<http://www.inta.gov.ar>.

70. **HINSHAW, R.**, Evaluating electronic estrus detection in a contract recipient bovine embryo transfer program., Virginia Polytechnic Institute and State University., 2007.
E-books
<http://www.ashbyvets.com>.

71. **MÉXICO, UNIÓN GANADERA REGIONAL DE JALISCO (UGRJ).**, Transferencia de embriones en ganado bovino., Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, México., 2012.
E-books
<http://www.ugrj.org.mx>.
72. **PALMA, G.**, Biotecnología de Reproducción. Evaluación morfológica de los embriones., 2010.
E-books
<http://www.reprobiotec.com>.
73. **SERRANO, J.**, Clasificación y calificación embrionaria. 2009.
E-books
<http://jairoserano.com/2009/>.
74. **CONTROL ENDOCRINO DE LA REPRODUCCIÓN EN BOVINOS Y USOS.**, 2007.
E-books
<http://zootecniaymas.blogspot.com>.
75. **FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA DEL BOVINO.**, 2010.
E-books
<http://www.produccion-animal.com.ar>.

76. LABORATORIO BIONICH 2012.

E-books

<http://www.BionicheAnimalHealth.com>.

77. OVAGEN., LABORATORIO SYNTEX., 2013.

E-books

<http://www.viarural.com.ar/viarural.com.ar>.

**78. PROTEINA Y SU IMPACTO EN EL GANADO LECHERO.,
2012.**

E-books.

<http://www.salesganasal>.

ANEXOS

Anexo 1. Registro de los resultados de campo de las vacas que fueron sometidas a dos programas de superovulación.

								EMBRIONES Y ESTRUCTURAS								
HACIENDA	GnRH	Tratam	RAZA	EDAD	Peso	Cond. Corp.	Ovulac.	TOTAL	OV	MT	MC	ME	B	BT	BP	ED
ANA ROSA	NO	T1	BS	3	420	3,00	+	7			6		1			
CHARRON	NO	T1	BS	4	450	3,25	+	5		4						1
CHARRON	NO	T1	BS	5	454	3,25	+	12			6	1	5			
CHARRON	SI	T2	BS	5	461	3,50	+	12		11	1					
CHARRON	NO	T1	BS	6	471	3,25	+	6					5			1
CHARRON	SI	T2	BS	6	495	3,50	+	10	1	7	2					
CHARRON	NO	T1	BS	7	500	3,50	+	14					5		2	7
CHARRON	SI	T2	BS	7	510	3,50	+	14	5	6	1					2
CHARRON	SI	T2	BS	7	515	3,75	+	6					5	1		
ANA ROSA	NO	T1	BS	12	530	3,75	+	14			7		5			2
ANA ROSA	NO	T1	BS	12	540	4,00	+	12			7	5				
ANA ROSA	SI	T2	BS	12	546	4,00	+	17		7	8					2
ANA ROSA	SI	T2	BS	12	550	4,00	+	27	1		24					2
PUCATE	SI	T2	HF	4	510	3,00	+	6			6					
PUCATE	NO	T1	HF	5	521	3,25	-									
PINGUILLA	NO	T1	HF	7	550	3,25	+	3					3			
PUCATE	NO	T1	HF	7	570	3,50	+	6			6					
PINGUILLA	SI	T2	HF	8	604	3,50	+	10			9					1
PUCATE	SI	T2	HF	8	609	3,50	-									
JAYA	NO	T1	JERSEY	5	350	3,00	+	5				5				
JAYA	SI	T2	JERSEY	5	365	3,25	+	5				5				
EL PUENTE	SI	T2	JERSEY	9	380	3,25	+	1				1				
INIAP	NO	T1	JERSEY	13	398	3,25	-									
INIAP	SI	T2	JERSEY	13	400	3,50	+	10			9					1

OV: OVULO

MT: MORULA TEMPRANA

MC: MORULA COMPACTA

ME: MORULA EXPANDIDA

B: BLASTOCISTO

BT: BLASTOCISTO TEMPRANO

B: BLASTOCISTO PROTRUIDO

ED: EMBRION
DEGENERADO

Anexo 2. Clasificación de las vacas lecheras que fueron sometidas a dos programas de superovulación, según el grupo genético

Grupo genético: Brwon swiss

HACIENDA	GnRH	Tratam	RAZA	EDAD	Peso	Cond. Corp.
ANA ROSA	NO	T1	BS	3	420	3,00
CHARRON	NO	T1	BS	4	450	3,25
CHARRON	NO	T1	BS	5	454	3,25
CHARRON	SI	T2	BS	5	461	3,50
CHARRON	NO	T1	BS	6	471	3,25
CHARRON	SI	T2	BS	6	495	3,50
CHARRON	NO	T1	BS	7	500	3,50
CHARRON	SI	T2	BS	7	510	3,50
CHARRON	SI	T2	BS	7	515	3,75
ANA ROSA	NO	T1	BS	12	530	3,75
ANA ROSA	NO	T1	BS	12	540	4,00
ANA ROSA	SI	T2	BS	12	546	4,00
ANA ROSA	SI	T2	BS	12	550	4,00
Promedio				7,54	495,54	3,56
Desv. Estd.				3,31	41,42	0,33

Grupo genético: Holstein Friesian

PUCATE	SI	T2	HF	4	510	3,00
PUCATE	NO	T1	HF	5	521	3,25
PINGUILLA	NO	T1	HF	7	550	3,25
PUCATE	NO	T1	HF	7	570	3,50
PINGUILLA	SI	T2	HF	8	604	3,50
PUCATE	SI	T2	HF	8	609	3,50
Promedio				6,50	560,67	3,33
Desv. Estd.				1,64	41,37	0,20

Grupo genético: Jersey

JAYA	NO	T1	JERSEY	5	350	3,00
JAYA	SI	T2	JERSEY	5	365	3,25
EL PUENTE	SI	T2	JERSEY	9	380	3,25
INIAP	NO	T1	JERSEY	13	398	3,25
INIAP	SI	T2	JERSEY	13	400	3,50
Promedio				9,00	378,60	3,25
Desv. Estd.				4,00	21,44	0,18

Anexo 3. Análisis estadísticos según la prueba de Ji cuadrado del porcentaje de vacas lecheras que respondieron a los programas de superovulación.

T1: Dispositivos intravaginales de P4 (DIB) + EB sin GnRH en la 1ª I.A.

T2: Dispositivos intravaginales de P4 (DIB) + EB + GnRH en la 1ª I.A.

	Ovuladas		No ovuladas		Total		X ² cal	X ² tab
	Nº	%	Nº	%	Nº	%		
Tratamientos							3,18	3,84
T1	10	83,33	2	16,67	12	100		
T2	11	91,67	1	8,33	12	100		
Raza							38,51	5,99
Brown swiss	13	100,00	0	0,00	13	100		
Holstein								
Friesian	4	66,67	2	33,33	6	100		
Jersey	4	80,00	1	20,00	5	100		

Por efecto de los tratamientos

Observados

	Ovula.	No ovu.	Total
T1	83,33	16,67	100
T2	91,67	8,33	100
Total	175	25	200

Calculo de
X²

O	E	(O-E)	(o-E) ²	(O-E) ² /E
83,33	87,50	-4,17	17,39	0,20
16,67	12,50	4,17	17,39	1,39
91,67	87,50	4,17	17,39	0,20
8,33	12,50	-4,17	17,39	1,39
X ² =				3,18

Esperados

T1	87,5	12,5
T2	87,5	12,5

X² tab 0,05 = 3,84

X² tab > X² cal; no existen diferencias estadísticas

Por efecto de las razas

Observados

	Ovula.	No ovu.	Total
Brown swiss	100,00	0,00	100,00
Holstein			
Friesian	66,67	33,33	100,00
Jersey	80,00	20,00	100,00
Total	246,67	53,33	300

Calculo de
X²

O	E	(O-E)	(o-E) ²	(O-E) ² /E
100,00	82,22	17,78	316,01	3,84
0,00	17,78	17,78	316,01	17,78
66,67	82,22	15,55	241,91	2,94
33,33	17,78	15,55	241,91	13,61
80,00	82,22	-2,22	4,94	0,06
20,00	17,78	2,22	4,94	0,28
X ² =				38,51

Esperados

Brown swiss	82,22	17,78
Holstein		
Friesian	82,22	17,78
Jersey	82,22	17,78

X² tab 0,05 = 5,99

X² tab < X² cal; existen diferencias estadísticas

Anexo 4. Análisis estadísticos de las estructuras y embriones obtenidos de vacas lecheras por efecto de dos programas de superovulación.

T1: Dispositivos intravaginales de P4 (DIB) + EB sin GnRH en la 1ª I.A.

T2: Dispositivos intravaginales de P4 (DIB) + EB + GnRH en la 1ª I.A.

ESTRUCTURAS

TOTALES, Nº

T1	T2			
7	12	Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
5	10		T1	T2
12	14	Media	8,400	10,727
6	6	Varianza	17,156	49,018
14	17	Observaciones	10,000	11,000
14	27	Diferencia hipotética de las medias	0,000	
12	6	Grados de libertad	16,000	
3	10	Estadístico t	-0,937	
6	5	P(T<=t) una cola	0,181	
5	1			
	10			

MORULA

COMPACTA, Nº

T1	T2			
		Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
6	1		T1	T2
6	2	Media	6,400	7,500
	1	Varianza	0,300	56,286
7	8	Observaciones	5,000	8,000
7	24	Diferencia hipotética de las medias	0,000	
6	6	Grados de libertad	7,000	
	9	Estadístico t	-0,413	
	9	P(T<=t) una cola	0,346	

MORULA

EXPANDIDA, Nº

T1	T2			
		Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
1	5		T1	T2
5	1	Media	3,667	3,000
5		Varianza	5,333	8,000
		Observaciones	3,000	2,000
		Diferencia hipotética de las medias	0,000	
		Grados de libertad	2,000	
		Estadístico t	0,277	
		P(T<=t) una cola	0,404	

continua

Continuación Anexo 4.

MORULA
TEMPRANA, Nº

T1	T2	Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
			T1	T2
4	11			
	7	Media	4,000	7,750
	6	Varianza		4,917
	7	Observaciones	1,000	4,000
		Diferencia hipotética de las medias	0,000	
		Grados de libertad	0,000	
		Estadístico t	-3,382	
		P(T<=t) una cola	**	

BLASTOCISTO, Nº

T1	T2	Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
			T1	T2
1	5			
5		Media	4,000	5,000
5		Varianza	2,800	
5		Observaciones	6,000	1,000
5		Diferencia hipotética de las medias	0,000	
3		Grados de libertad	0,000	
		Estadístico t	-1,464	
		P(T<=t) una cola	ns	

EMBRION
DEGENERADO, Nº

T1	T2	Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
			T1	T2
1	2			
1	2	Media	2,750	1,600
7	2	Varianza	8,250	0,300
2	1	Observaciones	4,000	5,000
	1	Diferencia hipotética de las medias	0,000	
		Grados de libertad	3,000	
		Estadístico t	0,789	
		P(T<=t) una cola	0,244	

Anexo 5. Análisis estadísticos de los embriones viables y no viables obtenidos de vacas lecheras por efecto de dos programas de superovulación.

T1: Dispositivos intravaginales de P4 (DIB) + EB sin GnRH en la 1ª I.A.

T2: Dispositivos intravaginales de P4 (DIB) + EB + GnRH en la 1ª I.A.

Embriones viables,
Nº

T1	T2	Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
			T1	T2
7	12			
4	9	Media	7,100	9,364
12	7	Varianza	12,544	37,055
5	6	Desv. Estandar	3,542	6,087
5	15	Observaciones	10,000	11,000
12	24	Diferencia hipotética de las medias	0,000	
12	6	Grados de libertad	16,000	
3	9	Estadístico t	-1,053	
6	5	P(T<=t) una cola	0,154	
5	1			
	9			

Embriones no viables, Nº

T1	T2	Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales		
			T1	T2
1	1			
	7	Media	3,250	2,500
1		Varianza	14,917	5,500
9	2	Desv. Estandar	3,862	2,345
2	3	Observaciones	4,000	6,000
	1	Diferencia hipotética de las medias	0,000	
	1	Grados de libertad	4,000	
		Estadístico t	0,348	
		P(T<=t) una cola	0,373	

Anexo 6. Análisis estadísticos según la prueba de Ji cuadrado del porcentaje de embriones viables obtenidos de vas lecheras sometidas a dos programas de superovulación.

T1: Dispositivos intravaginales de P4 (DIB) + EB sin GnRH en la 1ª I.A.

T2: Dispositivos intravaginales de P4 (DIB) + EB + GnRH en la 1ª I.A.

	Viables	No viables	Total		
	%	%	%	X ² cal	X ² tab
Tratamientos				0,32	3,84
T1	84,50	15,50	100		
T2	87,30	12,70	100		
Raza				13,02	5,99
Brown swiss	83,33	16,67	100		
Holstein Friesian	96,00	4,00	100		
Jersey	95,24	4,76	100		

Por efecto de los tratamientos

Observados

	Viables	No viables	Total
T1	84,5	15,5	100
T2	87,3	12,7	100
Total	171,8	28,2	200

Esperados

T1	85,9	14,1
T2	85,9	14,1

Calculo de X²

O	E	(O-E)	(o-E) ²	(O-E) ² /E
84,50	85,90	-1,40	1,96	0,02
15,50	14,10	1,40	1,96	0,14
87,30	85,90	1,40	1,96	0,02
12,70	14,10	-1,40	1,96	0,14
X ² =				0,32

X² tab 0,05 = 3,84

X² tab > X² cal; no existen diferencias estadísticas

Por efecto de las razas

Observados

	Viables	No viables	Total
Brown swiss	83,33	16,67	100,00
Holstein Friesian	96,00	4,00	100,00
Jersey	95,24	4,76	100,00
Total	274,57	25,43	300,00

Esperados

Brown swiss	91,523	8,477
Holstein Friesian	91,523	8,477
Jersey	91,523	8,477

Calculo de X²

O	E	(O-E)	(o-E) ²	(O-E) ² /E
83,33	91,52	-8,19	67,13	0,73
16,67	8,48	8,19	67,13	7,92
96,00	91,52	4,48	20,04	0,22
4,00	8,48	-4,48	20,04	2,36
95,24	91,52	3,72	13,81	0,15
4,76	8,48	-3,72	13,81	1,63
X ² =				13,02

X² tab 0,05 = 5,99

X² tab < X² cal; existen diferencias estadísticas

